2153

THESE PRESENTEE

A L'UNIVERSITE DE PARIS SUD

CENTRE D'ORSAY

Pour obtenir le titre de Docteur 3ème Cycle

par

Aliette FILIATRE

Sujet de la thèse : Caractérisation et répartition histologique des glucides des graines de légumineuses : féverole, lupin, pois ridé et lisse.

Soutenue le : 16 septembre 1976 devant la commission d'examen

MM. J.C. PATTE - Président

P. THIVEND
A. GUILBOT
J. BEROARD-CERNING
} Examinateurs

THESE PRESENTEE

A L'UNIVERSITE DE PARIS SUD

CENTRE D'ORSAY

Pour obtenir le titre de Docteur 3ème Cycle

par

Aliette FILIATRE

Sujet de la thèse : Caractérisation et répartition histologique des glucides des graines de légumineuses : féverole, lupin, pois ridé et lisse.

Soutenue le : septembre 1976 devant la commission d'examen

MM. J.C. PATTE - Président

P. THIVEND
A. GUILBOT
J. BEROARD-CERNING
} Examinateurs

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

A mes parents

A ma famille

A mes amis

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41548114_0036

AVANT - PROPOS

Cett étude a été effectuée à la Station de Biochimie et Physico-chimie des Céréales et Dérivés de l'I.N.R.A., à Massy.

Je remercie Monsieur André GUILBOT, Directeur de la Station, Directeur de Recherches à l'I.N.R.A., de m'y avoir accueillie et d'avoir accepté de faire partie du jury de cette thèse.

J'exprime toute ma reconnaissance à Madame Jutta CERNING-BEROARD, Chargée de Recherches à l'I.N.R.A., qui m'a permis sous sa direction attentive d'entreprendre ce travail et de le conduire à son terme.

J'adresse mes remerciements à Monsieur le Professeur Jean-Claude PATTE de la Faculté des Sciences d'Orsay qui a bien voulu me faire l'honneur d'accepter la présidence de ce jury de thèse.

Je tiens à remercier Monsieur Pierre THIVEND, Maître de Recherches à l'I.N.R.A. de Clermont-Ferrand pour l'honneur qu'il me fait en acceptant d'être le rapporteur de ce travail.

Il m'est agréable d'exprimer ma sincère gratitude à Monsieur LALLEMAND de la Grande Minoterie à fèves de Marseille, pour l'aide efficace qu'il m'a apportée dans le décorticage de mes échantillons.

Mes remerciements s'adressent à Madame Marie-Thérèse TOLLIER, Ingénieur du C.N.A.M., et à Monsieur Jean-Pierre ROBIN, Chargé de Recherches à l'I.N.R.A., pour leur collaboration.

Enfin, que Madame Christiane MERCIER-GREENWOOD, Madame Josette RAULT, Monsieur J.F. THIBAULT, Madame Toussainte INZERILLO, pour le dévouement avec lequel ils ont participé à la réalisation de ce travail, ainsi que ceux qui à des titres divers, ont contribué à l'achèvement de cette étude, trouvent ici le témoignage de toute ma reconnaissance.

P L A N

Page

INTRODUCTION 1

1 - MATERIEL ETUDIE 3

1.1 - Généralités 3

1.2 - Echantillons étudiés 3

1.3 - Préparation des échantillons 5

2 - COMPOSITION BIOCHIMIQUE GLOBALE DES ECHANTILLONS 5

2.1 - Méthodes utilisées 5

2.1.1 - Glucides éthanolosolubles et polyosides 5

2.1.2 - Protéines 9

2.1.3 - Lipides 9

2.1.4 - Cendres 9

2.2 - Résultats et discussion 9

3 - GLUCIDES ETHANOLOSOLUBLES 20

3.1 - Méthodes utilisées 20

3.1.1 - Caractérisation qualitative 20

3.1.2 - Dosage enzymatique 21

3.1.3 - Chromatographie quantitative 21

3.2 - Résultats et discussion 22

4 - GLUCIDES HYDRO- ET ACIDOSOLUBLES 35

4.1 - Méthodes utilisées 35

4.1.1 - Glucides hydrosolubles 35

4.1.2 - Glucides acidosolubles 36

4.2 - Résultats et discussion 37

4.2.1 - Matières pectiques 37

4.2.2 - Hémicelluloses 37

4.2.3 - "Polymères de glucose, non cellulosiques" 48

RESUME ET CONCLUSIONS GENERALES 53

I N T R O D U C T I O N

La culture des graines de légumineuses est connue, par l'homme, depuis l'antiquité. A l'exception des périodes de crises, les surfaces occupées par ces graines ont diminué régulièrement jusqu'aux années soixante. A cette époque nous disposions encore de protéines importées et en particulier de celles de soja, peu coûteuses en ce temps.

La pénurie mondiale de protéines et le souci d'acquérir une certaine indépendance économique à l'égard des puissances étrangères ont largement modifié cette situation.

Les graines de légumineuses constituent, en effet, une source européenne susceptible de participer à l'approvisionnement en protéines végétales et à leur diversification. Ainsi, l'étude des protéagineux tels que la féverole, le lupin et le pois bénéficie actuellement d'un regain d'intérêt. Grâce à l'effort des généticiens nous disposons à l'heure actuelle de variétés d'un rendement satisfaisant et d'une résistance accrue vis-à-vis des maladies.

Il est logique que les recherches biochimiques se soient d'abord concentrées sur l'étude des acides aminés, de la disponibilité et de la digestion des protéines des légumineuses, laissant quelque peu dans l'ombre la composition glucidique de ces graines. Or, ces glucides sont loin d'être négligeables puisqu'ils représentent de 50 à 70 % des graines de féverole et de pois et environ 35 % des graines de lupin.

Les études réalisées dans le domaine des glucides complexes tels que les α-galactosides du saccharose, qui semblent pourtant être à l'origine de troubles digestifs, sont peu nombreuses.

Dans l'espoir de contribuer à une meilleure connaissance de ce matériel biologique, nous avons entrepris, en premier lieu, l'analyse des graines entières et des éléments anatomiques (cotylédons et téguments) de la féverole, du lupin et du pois, pour

établir la composition biochimique totale et déterminer la répartition histologique des différents constituants de ces graines.

Nous nous sommes également efforcés d'examiner, de façon approfondie, la fraction éthanolique de ces graines, constituée essentiellement d'α-galactosides du saccharose, au moyen de la chromatographie sur gel.

Finalement, pour mieux connaître la nature, la composition et la localisation de certains polyosides de structure (hémicelluloses et cellulose), ces constituants ont été analysés après hydrolyses successives, tant sur le plan qualitatif que sur le plan quantitatif.

L'ensemble de ces résultats nous permettra de comparer la composition biochimique des graines de légumineuses et nous conduira à la fois à une meilleure connaissance des glucides de ces graines et de leur répartition entre cotylédons et téguments.

1 - MATERIEL ETUDIE.

1.1 - GENERALITES.

La féverole, le pois et le lupin font partie de la famille des légumineuses qui regroupe de nombreuses plantes, parmi lesquelles figure également le soja.

Le pois et la féverole font partie de la tribu des Vicieae et appartiennent respectivement aux espèces Pisum et Vicia faba. Le lupin figure dans la tribu des Genisteae, il appartient au genre Lupineae et à l'espèce Lupinus.

Ces graines sont des dicotylédones, constituées d'un tégument externe dur, en proportion variable selon les espèces, de deux cotylédons et d'un germe.

1.2 - ECHANTILLONS ETUDIES.

L'origine et le lieu de culture de chaque échantillon, sont indiqués dans le tableau I, où sont rassemblés également les caractères morphologiques des graines entières, des cotylédons et des téguments.

Chaque échantillon est désigné par les abréviations suivantes, dont nous nous servirons dans la suite de ce texte :

F : graine entière de la féverole bianka.
L : graine entière du lupin jaune.
PR : graine entière du pois ridé.
PL : graine entière du pois lisse.

chacune de ces initiales, suivie de l'indice C désigne les cotylédons de la graine considérée ; l'indice T désigne les téguments.

La féverole Bianka a la particularité de ne pas contenir de tanins condensés. La présence de ces derniers dans un régime pour animaux entraine généralement une diminution de sa valeur alimentaire.

Le lupin jaune est récolté avec un moins bon rendement que d'autres variétés, comme le lupin blanc, mais il donne de meilleures performances en alimentation animale.

Il nous a semblé intéressant de choisir un pois lisse et un pois ridé puisque leur composition biochimique est différente, malgré leur appartenance à la même espèce.

Tableau 1 : Origine géographique, lieu de culture et caractéristiques des graines de féveroles, de lupins et de pois.

Espèce	Vicia faba	Lupinus	Pisum	
Variété	Féverole Bianka	Lupin jaune Weiko III	Pois ridé Lincoln	Pois lisse Dicktrom
Origine géographique	Hollande (sélection pour conserve)	Allemagne	Angleterre	Hollande (pois de casserie)
Lieu de culture	Dijon	Dijon	Dijon	Dijon
Graines entières	F	L	PR	PL
Aspect	Partiellement ridée et aplatie	Lisse et aplatie	Entièrement ridée et cylindro-cubique	Très légèrement ridée et ovoïde
Dimensions en mm (longueur x largeur x épaisseur)	15 à 17 x 12 à 15 x 6	6 à 8 x 5 à 6 x 3	6 x 6 x 5	8 x 7 x 7
Poids de 100 graines sèches (en gramme)	67,4	11,6	15,5	19,6
Cotylédons	F_C	L_C	PR_C	PL_C
Aspect extérieur	Jaunâtre. Partiellement ridé	Jaune d'or. Lisse	Jaune d'or. Ridé	Vert. Très peu ridé
Aspect intérieur	Jaune très pâle Lisse	Jaune d'or Granuleux	Jaune pâle Lisse	Jaune, verdâtre, pâle Lisse
Téguments	F_T	L_T	PR_T	PL_T
Couleur	Beige verdâtre	Beige clair	Jaune - Beige	Vert
Proportion par rapport à la graine entière (p.100)	12,54	24,12	10,68	8,65

1.3 - PREPARATION DES ECHANTILLONS.

Le décorticage des graines a été réalisé aux Grandes Minoteries à fèves de Marseille. Il a été effectué par concassage sur meules Emeri puis blutage densimétrique.

Au laboratoire, les deux parties histologiques, cotylédons et téguments, ont été triéesde façon à éliminer les fragments de germe.

Les échantillons ont été broyés au Bühler, en présence de neige carbonique, jusqu'à obtention d'une taille de particules inférieure à 0,5 mm.

2 - COMPOSITION BIOCHIMIQUE GLOBALE DES ECHANTILLONS.

2.1 - METHODES UTILISEES.

2.1.1 - Glucides éthanolosolubles et polyosides.

2.1.1.1 - Glucides éthanolosolubles totaux.

Extraction des oses et osides éthanolosolubles.

La méthode utilisée est celle de CERNING (1970). Elle consiste à chauffer l'échantillons (2,5 g) à reflux, en présence d'éthanol à 80 % (40 ml) et à le maintenir à ébullition pendant 30 minutes.

Après centrifugation et décantation du surnageant, répéter l'extraction une autre fois. Effectuer ensuite deux lavages successifs à froid avec l'éthanol. Complèter à un volume donné (250 ml) avec l'éthanol à 80 %.

Le résidu insoluble (résidu I) est séché dans un dessiccateur.

Ramener un volume de 200 ml de l'extrait éthanolique à 5 ml environ, par évaporation à l'évaporateur rotatif à 40°C. Ajouter les réactifs de CARREZ I et II qui permettent la défécation des protéines et des lipides. Compléter à un volume donné, avec de l'eau distillée, et filtrer. On obtient un extrait aqueux limpide.

Un tel mode opératoire assure un épuisement complet de l'échantillon en glucides éthanolosolubles et permet leur extraction jusqu'à un poids moléculaire de 2.000, soit environ 15 unités en chaîne. De plus, l'extraction en milieu éthanolique a l'avantage d'inhiber les enzymes présentes.

Dosage des glucides éthanolosolubles par la méthode à l'anthrone. (LOEWUS, 1952. TOLLIER, 1965).

L'acide sulfurique concentré, à chaud, agit sur les hexoses et leurs homologues supérieurs en formant du 5-hydroxyméthyl furfural qui produit avec l'anthrone une coloration verte dont l'intensité est proportionnelle à la quantité de glucides présents. La coloration présente un maximum à 625 nm et suit la loi de BEER-LAMBERT pour une concentration en glucides comprise entre 30 et 120 µg.

La reproductibilité de la méthode est de 2,5 %.

2.1.1.2 - Amidon.

La méthode utilisée est celle de THIVEND et al. (1972). Elle consiste à disperser l'amidon par empesage rapide du résidu I (résidu insoluble après extraction éthanolique), puis par autoclavage de l'empois, sous une pression de 1,8 kg/cm2 pendant une heure, de façon à détruire entièrement la structure des grains d'amidon. L'amidon ainsi dispersé est hydrolysé quantitativement en glucose, sous l'action d'une glucoamylase (E.C.3.2.1.3), spécifique des liaisons αD (1-4) et αD (1-6), dans les conditions optimales de température et de pH de l'enzyme (55°C - pH 4,7).

Le filtrat de l'attaque par la glucoamylase renferme le glucose provenant de l'hydrolyse de l'amidon et un certain nombre d'autres composés solubilisés par le traitement de l'autoclavage. La partie insoluble constitue le résidu II.

Le glucose provenant de l'hydrolyse de l'amidon est dosé par la méthode à la glucose-oxydase (PIRT et WHELAN, 1951 ; HUGGETT et NIXON, 1957 ; TAUFEL,1963).

Le glucose est oxydé par la glucose-oxydase (E.C.1.1.3.4) en acide gluconique, avec libération d'eau oxygénée. Sous l'action de la peroxydase (E.C.1.11.1.7), l'eau oxygénée réagit avec un donneur d'hydrogène : l'orthodianisidine :

$$\text{Glucose} + H_2O \xrightarrow[O_2]{\text{Glucose-oxydase}} \text{Acide gluconique} + H_2O_2$$

$$H_2O_2 + DH_2 \xrightarrow{\text{Peroxydase}} 2H_2O + D$$

DH_2 : colorant sous forme réduite.

D : colorant sous forme oxydée.

La coloration est mesurée à 400 nm, son intensité est proportionnelle à la quantité de glucose présent. La réaction suit la loi de BEER-LAMBERT entre 20 et 60 µg de glucose. La reproductibilité de la méthode est de 3 %.

2.1.1.3 - Générateurs de furfural totaux.

Ce dosage est réalisé selon la méthode initialement proposée par DUFFAU (1946) et modifiée par CERNING et GUILBOT (1973).

Les pentosanes sont hydrolysés par une solution d'acide chlorhydrique 4,25 N. Les pentoses libérés sont transformés par déshydratation en furfural. Celui-ci est entrainé par l'azéotrope eau-HCl et dosé spécifiquement après réaction avec l'acétate d'aniline.

L'intensité de la coloration, mesurée à 530 nm est proportionnelle à la quantité de pentoses présents entre 40 et 120 µg. Les résultats sont exprimés par rapport à une gamme de xylose. La reproductibilité est de l'ordre de 2 %.

Cette méthode a l'intérêt de permettre une distillation sans chauffage direct du milieu réactionnel ; de plus, le volume total d'acide ainsi que sa concentration, sont gardés constants tout au cours de l'opération.

Le furfural est déterminé spécifiquement en présence de grandes quantités de 5-hydroxyméthylfurfural, provenant des hexoses.

L'acide glucuronique n'interfère pas lorsque sa teneur par rapport au xylose est inférieure à 10 %. Une interférence de l'acide galacturonique se produit seulement si la quantité présente de cet acide uronique dépasse 20 %.

2.1.1.4 - Cellulose.

L'acide sulfurique, à forte concentration, disperse la cellulose à froid et la transforme complètement en glucose, à chaud.

Ajouter l'acide sulfurique à 72 %, au résidu insoluble obtenu (résidu III), après hydrolyse du résidu II par l'acide dilué (fig. 1). Laisser agir 4 heures à la température du laboratoire pour obtenir ainsi la dispersion de la cellulose (SALO, 1965).

Transvaser dans une fiole erlenmeyer rodée et ajouter de l'eau distillée (milieu 0,78 N). Chauffer à l'ébullition à reflux pendant 4 heures. Filtrer sur filtre préalablement taré. Le résidu obtenu est appelé résidu IV.

Neutraliser le filtrat sur résine Duolite A 102 D et ramener à un volume donné par évaporation à l'évaporateur rotatif. Doser le glucose libéré après hydrolyse de la cellulose, par la méthode à la glucose-oxydase précédemment décrite (cf 2.1.1.2).

2.1.1.5 - Lignine brute.

Peser le résidu IV après séchage à l'étuve. Incinérer les filtres dans un four à 600°C pour apprécier la quantité de matières minérales présentes et déterminer par différence la quantité de "lignine brute" contenue dans les échantillons (SALO, 1965). Il n'est pas exclu qu'une certaine quantité de protéines puisse subsister dans le résidu désigné "lignine brute".

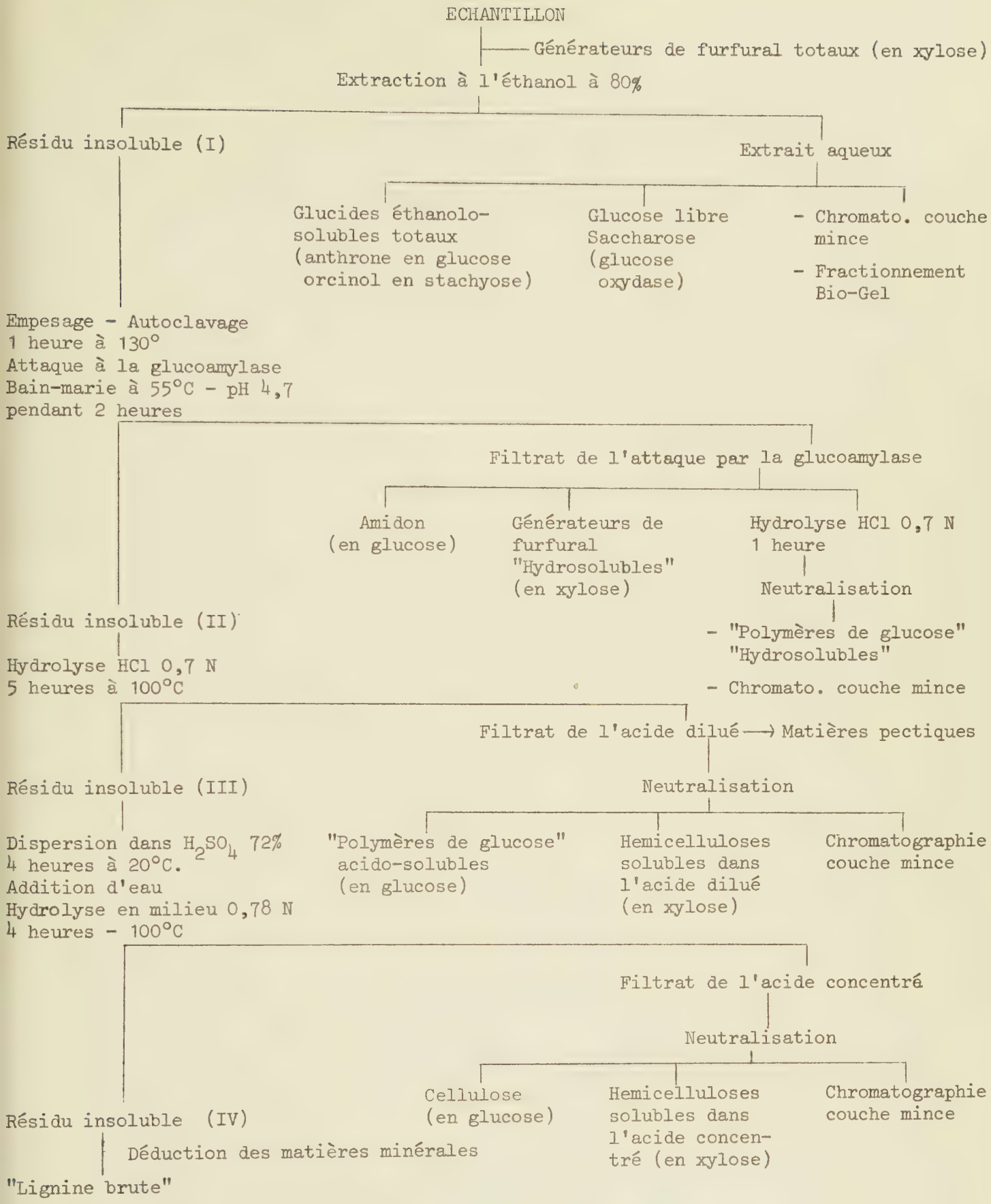


Figure 1 : Schéma de fractionnement et d'analyse pour l'étude de la composition glucidique des échantillons de légumineuses.

2.1.2 - Protéines.

La teneur en azote total est déterminée par la méthode de KJELDAHL. Pour apprécier la teneur en protéines, la quantité d'azote total est multipliée par 6,25.

2.1.3 - Lipides.

Les lipides ont été déterminés selon la méthode du C.N.E.R.N.A. (1958). Elle consiste à soumettre l'échantillon à une hydrolyse acide (HCl, d = 1,12) et à extraire les lipides par l'éther de pétrole.

2.1.4 - Cendres.

On appelle cendres le résidu de l'incinération de l'échantillon, dans des conditions opératoires précises. La prise d'essai est maintenue en atmosphère oxydante, une température de 550 - 650°C jusqu'à masse constante, pour garantir la combustion intégrale des matières organiques et pour éviter l'occlusion de traces de carbone, par une fusion prématurée du résidu (C.N.E.R.N.A., 1958).

2.2 - RESULTATS ET DISCUSSION.

La composition biochimique des cotylédons, des téguments et des graines entières de féverole, de lupin, de pois ridé et lisse est indiquée dans les tableaux II, III, IV, et V.

Glucides éthanolosolubles totaux, dosés à l'anthrone.

La teneur en glucides éthanolosolubles totaux des téguments est très faible : elle va de 0,4 % dans le lupin et le pois lisse à 1,1 % dans la féverole.

Les valeurs étant les plus élevées dans les cotylédons, les glucides éthanolosolubles totaux de la graine entière proviennent essentiellement de cette partie de la graine. Ils y sont les plus abondants dans le lupin (13,5 %) et le pois ridé (13,4 %) et en quantités plus faibles dans le pois lisse (8,2 %) et la féverole (7,6 %).

Tableau II : Composition biochimique des graines entières, des cotylédons et des téguments de la féverole Bianka.
Résultats exprimés en p.100 de la substance sèche et par rapport au poids de 100 graines sèches.

	COTYLEDONS		TEGUMENTS		GRAINES ENTIERES		BILAN
	p.100 s.s.	/100 graines sèches (59,0 g)	p.100 s.s.	/100 graines sèches (8,4 g)	p.100 s.s.	/100 graines sèches (67,4 g)	/100 graines sèches (59,0g + 8,4g)
Glucides éthanolosolubles totaux (dosés à l'anthrone)	7,58	4,5	1,10	0,1	7,10	4,8	4,6
Amidon	45,55	26,9	0,71	0,1	39,90	27,8	27,0
Générateurs de furfural totaux	2,85	1,7	21,30	1,8	4,72	3,2	3,5
Cellulose	1,30	0,8	50,00	4,2	5,02	3,4	5,0
Lignine brute	Traces	Traces	10,68	0,9	1,08	0,7	0,9
Glucides totaux + lignine brute (non compris les matières pectiques)	57,28	33,9	83,79	7,1	57,82	39,9	41,0
Protéines (N x 6,25)	34,70	20,5	5,12	0,4	32,27	21,7	20,9
Lipides	1,23	0,7	0,17	Traces	1,1	0,7	0,7
Cendres	3,69	2,2	1,90	0,2	3,72	2,5	2,4
TOTAL	96,9	57,3	90,98	7,7	94,91	64,8	65,0

Tableau III : Composition biochimique des graines entières, des cotylédons et des téguments du lupin jaune Weiko III.
Résultats exprimés en p. 100 de la substance sèche et par rapport au poids de 100 graines sèches.

	COTYLEDONS		TEGUMENTS		GRAINES ENTIERES		BILAN
	p. 100 s.s.	/100 graines sèches (8,8 g)	p. 100 s.s.	/100 graines sèches (2,8 g)	p. 100 s.s.	/100 graines sèches (11,6 g)	/100 graines sèches 8,8g + 2,8 g)
Glucides éthanolosolubles totaux (dosés à l'anthrone)	13,48	1,2	0,39	0,01	9,50	1,1	1,22
Amidon	0,57	0,05	0,71	0,02	0,30	0,04	0,07
Générateurs de furfural totaux	4,45	0,4	28,20	0,8	10,50	1,2	1,2
Cellulose	2,16	0,2	52,58	1,5	14,71	1,7	1,7
Lignine brute	Traces	Traces	9,64	0,3	0,75	0,1	0,3
Glucides totaux + lignine brute (non compris les matières pectiques)	20,66	1,8	91,52	2,6	35,76	4,1	4,5
Protéines (N x 6,25)	54,21	4,8	4,48	0,1	41,43	4,8	4,9
Lipides	7,96	0,7	0,50	0,01	6,14	0,7	0,7
Cendres	5,48	0,5	1,25	0,04	4,68	0,5	0,5
TOTAL	88,31	7,8	97,75	2,7	88,01	10,1	10,6

Tableau IV : Composition biochimique des graines entières, des cotylédons et des téguments du pois ridé Lincoln.
Résultats exprimés en p.100 de la substance sèche et par rapport au poids de 100 graines sèches.

	COTYLEDONS		TEGUMENTS		GRAINES ENTIERES		BILAN
	p.100 s.s.	/100 graines sèches (13,8 g)	p.100 s.s.	/100 graines sèches (1,7 g)	p.100 s.s.	/100 graines sèches (15,5 g)	/100 graines sèches (13,8g + 1,7g)
Glucides éthanolosolubles totaux (dosés à l'anthrone)	13,38	1,8	0,61	0,01	10,20	1,6	1,8
Amidon	36,33	5,0	1,18	0,02	32,90	5,1	5,0
Générateurs de furfural totaux	4,79	0,7	26,26	0,4	6,34	1,0	1,1
Cellulose	2,38	0,3	49,13	0,8	8,47	1,3	1,1
Lignine brute	Traces	Traces	8,53	0,1	0,98	0,1	0,1
Glucides totaux + lignine brute (non compris les matières pectiques)	56,88	7,8	85,71	1,3	58,89	9,1	9,1
Protéines (N x 6,25)	33,08	4,6	4,37	0,07	30,82	4,8	4,7
Lipides	2,01	0,3	0,18	0,01	0,91	0,3	0,3
Cendres	3,12	0,4	1,38	0,02	3,20	0,5	0,4
TOTAL	95,09	13,1	91,64	1,4	94,82	14,7	14,5

Tableau V : Composition biochimique des graines entières, des cotylédons et des téguments du pois lisse Dicktrom.
Résultats exprimés en p.100 de la substance sèche et par rapport au poids de 100 graines sèches.

	COTYLEDONS		TEGUMENTS		GRAINES ENTIERES		BILAN
	p. 100 s.s.	/100 graines sèches (17,9 g)	p. 100 s.s.	/100 graines sèches (1,7 g)	p. 100 s.s.	/100 graines sèches (19,6 g)	/100 graines sèches (17,9 g+ 1,7g)
Glucides éthanolosolubles totaux (dosés à l'anthrone)	8,23	1,5	0,37	0,01	8,0	1,6	1,5
Amidon	53,17	9,5	0,70	0,02	47,9	9,4	9,5
Générateurs de furfural totaux	3,53	0,6	25,26	0,4	4,87	0,9	1,0
Cellulose	1,30	0,2	46,82	0,8	5,32	1,0	1,0
Lignine brute	Traces	Traces	9,56	0,2	0,48	0,1	0,2
Glucides totaux + lignine brute (non compris les matières pectiques)	66,23	11,8	82,71	1,4	66,57	13,0	13,2
Protéines (N x 6,25)	27,01	4,8	3,86	0,1	26,28	5,1	4,9
Lipides	1,22	0,2	0,25	0,01	1,35	0,3	0,2
Cendres	2,87	0,5	1,66	0,03	2,81	0,5	0,5
TOTAL	97,33	17,3	88,48	1,5	97,01	18,9	18,8

Les valeurs calculées par rapport à 100 graines sèches, pour les graines entières et en faisant le bilan cotylédons plus téguments, sont comparables : 4,8 et 4,6 g dans la féverole, 1,1 et 1,2 g dans le lupin, 1,6 et 1,8 g dans le pois ridé et 1,6 et 1,5 g dans le pois lisse. Ceci permet de constater que les méthodes utilisées sont suffisamment reproductibles et spécifiques.

La répartition des glucides éthanolosolubles totaux entre cotylédons et téguments de la féverole est comparable à celle observée par CERNING et al. (1975), bien que nous trouvions des résultats plus élevés. Ceci est vraisemblablement dû au fait que les variétés considérées sont différentes.

Les valeurs trouvées pour le lupin (13,48 %) sont supérieures à celles de HOVE (1974) qui dose 5,6 % de glucides éthanolosolubles dans les cotylédons. Cette différence s'explique par le fait que cet auteur, en utilisant l'éthanol à 95 %, n'a pu extraire que les glucides constitués, au maximum, de 3 unités en chaîne.

La teneur en glucides éthanolosolubles de la graine entière du pois lisse (8 %) est supérieure à celle indiquée par TAUFEL (1960) : cet auteur dose, en effet, 5,4 % d'oses et d'osides par chromatographie sur papier, technique qui ne permet pas de déterminer les α-galactosides de poids moléculaire élevé.

Amidon.

La quantité d'amidon présente dans les parties extérieures des graines est faible : les téguments du pois ridé en contiennent 1,2 %, ceux des autres graines 0,7 %.

L'amidon dosé dans la graine entière provient donc essentiellement des cotylédons : 45,5 % dans la féverole, 36,3 % dans le pois ridé et 53,2 % dans le pois lisse. Les valeurs concernant la féverole sont proches de celles de CERNING et al. (1975) et de LINEBACK et KE (1975). Nous confirmons les observations de MAC READY (1950), à savoir que le pois lisse est plus riche en amidon que le pois ridé.

La graine de lupin se distingue des autres graines, par son absence d'amidon. Ces observations sont en parfait accord avec celles de HOVE (1974).

Générateurs de furfural totaux.

Les graines entières de lupin sont les plus riches en générateurs de furfural totaux (10,5 %). Ceci s'explique, sans doute, par le plus grand pourcentage de téguments qui contiennent la plus grande quantité de ces polyosides (28,2 %). Etant donné que les générateurs de furfural sont des polyosides de structure, il est normal d'en trouver autant dans les téguments. Les seules valeurs trouvées dans la littérature concernent la féverole (CERNING , 1975). Elles sont comparables à celles observées ici pour la graine entière (5,6 %) et les cotylédons (3,5 %) mais beaucoup plus faibles pour les téguments (13,5 %).

Cellulose.

Les cotylédons sont pauvres en cellulose : 1,3 % dans la féverole, 2,2 % dans le lupin, 2,4 % dans le pois ridé et 1,3 % dans le pois lisse.

La cellulose constitue environ la moitié des téguments. C'est le polyoside de structure le plus abondant dans cette partie des graines de légumineuses : 50 % dans la féverole, 52,6 % dans le lupin, 49,1 % dans le pois ridé et 46,9 % dans le pois lisse. Ces valeurs sont voisines de celles trouvées par CERNING et al. (1975) dans la féverole (53,4 %) et par BAILEY (1974) dans le lupin (50,9 %).

Lignine brute.

La lignine "brute" n'est présente qu'à l'état de traces dans les cotylédons alors que les téguments en renferment de 8,5 à 10,7 %, selon les espèces.

Il est connu que les téguments des graines de légumineuses renferment principalement des polyosides de structure et nos résultats confirment ces observations. En effet, les générateurs de furfural totaux et la cellulose, constituent avec la "lignine brute" 82 % des téguments de féverole, 90,4 % des téguments de lupin, 84 % des téguments de pois ridé et 82 % des téguments de pois lisse. Cette composition souligne la nécessité d'un décorticage, avant d'introduire ces graines dans l'alimentation des monogastriques.

Cette opération est d'autant plus souhaitable qu'elle élimine également les tanins, connus pour leur rôle antinutritionnel dans l'alimentation animale. Certains chercheurs (BAILEY, 1974) pensent utiliser les téguments dans l'alimentation des ruminants.

La fraction glucidique représente la majeure partie des constituants de la graine. En effet les graines de féverole, de pois ridé et lisse contiennent respectivement 58 %, 59 % et 67 % de glucides totaux. Par contre, en raison de la quasi-absence de l'amidon, la graine de lupin contient seulement 36 % de glucides totaux. Cette carence en amidon est compensée par une teneur élevée en protéines.

Protéines.

Les protéines sont, après les glucides, les constituants pondéralement les plus importants des graines de féverole et de pois. Leur teneur est de 32,3 % dans la féverole, 41,4 % dans le lupin, 30,8 % dans le pois ridé et 26,3 % dans le pois lisse. Les valeurs vont jusqu'à 54,2 % dans les cotylédons du lupin. Compte tenu de leur teneur élevée en protéines, les graines de lupin constituent une source appréciable de matières protéiques. Elles ont, comme les protéines des autres légumineuses, une composition équilibrée en acides aminés, malgré une certaine déficience en méthionine (HOVE, 1974). L'utilisation des graines de lupin, en alimentation animale, peut être envisagée à condition d'y ajouter cet acide aminé.

Quant à la féverole, certaines variétés, par leur plus faible activité antitrypsique, semblent présenter un avantage par rapport au soja (BATTY, 1974).

Lipides.

La teneur en lipides est faible dans les téguments : environ 0,2 % pour la féverole, le pois ridé, le pois lisse et 0,5 % pour le lupin.

La graine entière et les cotylédons de féverole, de pois ridé et lisse en contiennent respectivement 1,1 et 1,2 %, 1,9 et 2,0 % 1,35 et 1,2 % soit de l'ordre de 1,2 % dans la féverole et le pois

lisse et de l'ordre de 2 % dans le pois ridé. Le lupin en renferme beaucoup plus : 6,1 % dans la graine entière et 8 % dans les cotylédons. La nature et la proportion des acides gras des lipides de lupin semblent voisines de celles du soja (HANSEN, 1974).

Les glucides éthanolosolubles, l'amidon, les protéines et les lipides constituent la majeure partie des cotylédons étudiés, comme l'indique le tableau VI.

Tableau VI : Teneurs en glucides éthanolosolubles, amidon, protéines et lipides des cotylédons des graines de légumineuses. (Résultats exprimés en p.100 de la substance sèche)

Cotylédons de :	Glucides éthanolosolubles + Amidon	Protéines	Lipides	TOTAL
Féverole	53,13	34,70	1,23	89,06
Lupin	14,05	54,21	7,96	76,22
Pois ridé	49,71	33,08	2,01	84,80
Pois lisse	61,40	27,01	1,22	89,63

Cendres.

Les téguments de féverole renferment 1,9 % de cendres, ceux des lupin, pois ridé et lisse en contiennent respectivement 1,25 %, 1,4 % et 1,7 %.

Les cotylédons de lupin sont légèrement plus riches en cendres que la graine entière : 5,5 % au lieu de 4,7 %. Les valeurs sont proches dans le cas des cotylédons et de la graine entière de féverole (3,7 %), de pois ridé (3,1 et 3,2 %), et de pois lisse (2,9 et 2,8 %).

BILAN ANALYTIQUE.

La sommation de l'ensemble des composés déterminés dans la graine entière et dans la graine reconstituée (cotylédons + téguments), exprimée par rapport au poids de 100 graines sèches, fournit des valeurs proches pour les quatre échantillons étudiés :

Graine entière	et	Graine reconstituée	
64,8	et	65 g	pour la féverole
10,1	et	10,6 g	pour le lupin
14,7	et	14,5 g	pour le pois ridé
18,9	et	18,8 g	pour le pois lisse

Les mêmes résultats, exprimés en p.100 de la substance sèche, aboutissent à un bilan de plus ou moins proche de 100 %, selon l'échantillon et la partie de la graine considérés.

Si l'on peut considérer un bilan de 97 %, dans le cas des cotylédons de féverole, et à la limite celui de 95 %, dans la graine entière, comme étant satisfaisants, il n'en est pas de même en ce qui concerne les téguments ; ici, en effet, le bilan de 91 % est nettement déficitaire. Les mêmes remarques peuvent être formulées à propos des pois lisse et ridé (tableaux IV et V), à savoir que le bilan analytique, dans le cas des cotylédons et des graines entières est tout à fait convenable alors que celui des téguments montre un déficit considérable (pois lisse : 88,5 %, pois ridé : 91,6 %). Quant au lupin, c'est l'inverse qui se produit ; seulement pour les téguments, on peut estimer avoir abouti à un bilan correct (97,8 %) tandis que la somme des constituants dosés dans les cotylédons et la graine entière est respectivement 88,3 et 88 %.

Ainsi, à l'exception du lupin, il devient évident que si les méthodes utilisées dans l'étude des graines entières et des cotylédons donnent un bilan satisfaisant, elles souffrent de quelques défauts lorsqu'elles sont appliquées à un matériel complexe tel que les téguments.

Ce point particulier mis à part, il ressort d'une recherche bibliographique que les glucides des graines de légumineuses, malgré leur abondance, ont fait l'objet d'un nombre limité d'études.

Les renseignements fournis par la littérature sont très fragmentaires et se limitent généralement à la composition glucidique globale.

Par contre, les fractions glucidiques complexes, tels que les polyosides de structure et les α-galactosides, loin d'être négligeables, tant sur le plan de la quantité qu'ils représentent que sur le plan de leur utilisation en alimentation, ont été peu étudiées.

En effet, à notre connaissance, seuls quatre auteurs ont abouti à des résultats quantitatifs en ce qui concerne la fraction des α-galactosides qui, pourtant, sont connus pour jouer un rôle dans l'alimentation animale.

A l'exception des travaux de CERNING et al. (1975), les résultats ont été obtenus par chromatographie sur papier, technique dont on ne peut généralement pas attendre une très grande reproductibilité. Cette technique a, en plus, l'inconvénient de ne pas permettre la détermination des α-galactosides de poids moléculaire élevé.

Depuis à peine une dizaine d'années les techniques de chromatographie moderne, telles que la chromatographie sur gel de polyacrylamide, ont beaucoup évolué. Il nous a donc paru intéressant de l'appliquer à l'étude des α-galactosides. De ce fait, nous avons entrepris l'étude approfondie de la fraction éthanolique, dans le but de conduire à une meilleure connaissance des α-galactosides et de la quantité qu'ils représentent, dans différentes graines de légumineuses. De plus, ce travail nous a permis de déterminer la répartition de ces glucides entre les cotylédons et les téguments de chacune des graines considérées.

3 - GLUCIDES ETHANOLOSOLUBLES.

3.1 - METHODES UTILISEES.

3.1.1 - Caractérisation qualitative.

Les oses et osides sont caractérisés par chromatographie sur couche mince de gel de silice, le dépôt représente une quantité de glucides éthanolosolubles totaux de l'ordre de 30 µg. Le solvant est celui proposé par DE STEFANIS et PONTE (1968) : chloroforme - acide acétique - eau (44/47/3, v/v). Pour permettre une séparation plus complète de ces glucides, trois migrations sont effectuées dans ce solvant.

La révélation se fait par pulvérisation du réactif à la diphénylamine-aniline (GIRI et NIGAM, 1953) qui produit des colorations variables suivant la nature des oses et osides (tableau VII).

Tableau VII : Coloration des oses et osides, obtenue par révélation à la diphénylamine aniline.

Deoxysucres	Deoxyglucose - Deoxyribose	Rose - orangé
Sucres méthylés	Fucose - Rhamnose	Vert clair
Pentoses	Arabinose - Ribose - Xylose	Vert
Hexoses	Fructose	Brun ocre
	Galactose - Mannose	Gris bleu
	Glucose	Bleu gris
Diholosides	Maltose - Cellobiose	Bleu
	Melibiose	Bleu nuit
	Saccharose	Gris vert
α-Galactosides du saccharose	Raffinose - Stachyose - Verbascose et α-galactosides de PM plus élevé	Gris

3.1.2 - Dosage enzymatique.

Le glucose libre, de l'extrait aqueux, est dosé par la méthode à la glucose - oxydase. Cette méthode peut être étendue au dosage de l'unité de glucose du saccharose, après action de l'invertase (E.C.3.2.1.26) : CERNING-BEROARD, 1975.

Le pourcentage de saccharose est obtenu par la formule :

(Glucose Total - Glucose libre) x 1,9

3.1.3 - Chromatographie quantitative.

Les oses et osides sont séparés, selon leur poids moléculaire, (jusqu'à 15 unités en chaîne), par passage de l'extrait aqueux (maximum : 250 µl) sur gel de polyacrylamide (Bio-Gel P-2), à la température de 65°C, sous une pression de 6Kg/cm2 et avec un débit de 50 ml/heure (TRENEL, 1968. JOHN, 1969. ROBIN et TOLLIER, 1976).

Les glucides ainsi séparés sont dosés dans l'effluent de la colonne, par un système automatique basé sur la méthode colorimétrique à l'orcinol (KESLER, 1967. TOLLIER et ROBIN, 1976).

La densité optique est mesurée à 420 nm. La durée d'un fractionnement est de l'ordre de 6 heures.

Pour calculer les teneurs en oses et osides à partir des diagrammes d'élution, il est nécessaire d'établir des courbes d'étalonnage. Pour ce faire, on injecte en haut de la colonne des quantités croissantes (allant de 25 à 100 µg) d'une solution contenant 1 mg/ml de glucose, saccharose, raffinose, stachyose.

L'établissement des courbes d'étalonnage et l'expression des résultats des extraits peuvent être réalisés de deux façons :

- par lecture directe de densité optique correspondant à chacun des pics;
- par mesure de surface des pics, par triangulation (hauteur du pic x largeur à mi-hauteur).

Les substances de faible poids moléculaire, correspondant aux pics 1, 2 et 3 sont exprimées en glucose. (fig. 2, 3, 4, 5).

En absence de témoin pur, le verbascose, l'ajugose et les α-galactosides de poids moléculaire plus élevé sont exprimés par rapport à une gamme de stachyose.

Un autre mode de calcul, qui doit être considéré comme une tentative, consiste à déterminer la surface de chaque pic et à l'exprimer en fonction de la surface totale des pics du même chromatogramme. La surface totale est arbitrairement considérée comme étant égale au pourcentage de glucides éthanolosolubles totaux.

3.2 - RESULTATS ET DISCUSSION.

- Rappel.

Les glucides éthanolosolubles des graines de légumineuses, comprennent le saccharose et ses α-galactosides (FRENCH, 1954 - COURTOIS, 1971).

Les α-galactosides du saccharose sont consitués d'une molécule de base, le saccharose, sur laquelle sont fixés un ou plusieurs résidus galactose, par liaison α 1-6 :

$$\text{Galactose} \xrightarrow[\alpha\ 1\text{-}6]{} (\text{Galactose})_n \xrightarrow[\alpha\ 1\text{-}6]{} \text{Glucose} \xrightarrow[\beta\ 1\text{-}2]{} \text{Fructose}$$

n = o correspond à la molécule de raffinose, n = 1 au stachyose, n = 2 au verbascose, n = 3 à l'ajugose (COURTOIS, 1956, 1960). HATTORI (1958) mit en évidence un heptaose (n = 4) et un octaose (n = 5).

Un dosage enzymatique de chaque galactoside, s'avère impossible ; en effet une α-galactosidase couperait toutes les liaisons α 1-6, et il n'est pas possible de caractériser la provenance de toutes les unités galactose ainsi libérées.

L'utilisation de l'invertase, qui hydrolyse la liaison β 1-2 entre le glucose et le fructose, permet le dosage spécifique du saccharose, puisque dans ce cas, seul le glucose de ce diholoside a été libéré.

Résultats du dosage enzymatique.

Le glucose, absent dans les téguments, est présent à l'état de traces, dans les cotylédons et dans les graines entières, comme l'a constaté COURTOIS (1971) : 0,02 % dans la féverole et le lupin, moins de 0,01 % dans les pois ridé et lisse.

Les teneurs en saccharose figurent dans le tableau VIII.

Les graines entières et les cotylédons de pois ridé et lisse sont les plus riches en saccharose : 3,49 et 4,38 %, 3,05 et 3,23 %, alors que TAUFEL (1960) en dose 2,5 % dans la graine entière d'une autre variété de pois lisse, en utilisant la chromatographie sur papier.

Les cotylédons de féverole renferment 2,48 % de saccharose, tandis que LINEBACK (1975) trouve 3,17 % dans une farine d'une autre variété, cette différence semble être due au facteur variétal, comme l'avaient déjà constaté CERNING et al. (1975) dans une étude de variétés différentes de féverole, cultivées dans diverses régions de France.

Le lupin est le moins riche en saccharose, la graine entière contient 1 %, les cotylédons 1,13 %.

Dans tous les cas, les teneurs en saccharose sont faibles dans les téguments : 10 à 40 fois inférieures à celles trouvées dans les cotylédons.

Chromatographie.

. Identification des glucides éthanolosolubles.

La chromatographie sur couche mince de gel de silice, permet de caractériser le saccharose, le raffinose et le stachyose, dans tous les extraits aqueux. Ces chromatogrammes révèlent également la présence de constituants migrant moins que le stachyose et se colorant de la même façon, après révélation à la diphénylamine aniline ; ces constituants correspondent probablement à des α-galactosides de poids moléculaire plus élevé que le stachyose.

Tableau VIII : Teneur en saccharose des graines de légumineuses.
Résultats exprimés en p.100 de la substance sèche.

	COTYLEDONS	TEGUMENTS	GRAINES ENTIERES
Féverole	2,48	0,21	1,78
Lupin	1,13	0,07	1,00
Pois ridé	4,38	0,11	3,49
Pois lisse	3,23	0,08	3,05

Les chromatogrammes des extraits éthanoliques des graines entières et des cotylédons, obtenus après fractionnement sur une colonne de Bio-Gel, sont pratiquement identiques. Ainsi, nous nous sommes limités à représenter ceux correspondant aux téguments et aux cotylédons de chaque graine de légumineuse (fig. 2, 3, 4 et 5).

Nous avons identifié le saccharose, le raffinose, le stachyose et le verbascose dans tous les extraits. L'ajugose et les substances que nous avons appelées 1, 2, 3, A, B et C n'ont pas été décelés dans tous les cas.

Les pics A, B et C correspondent à des α-galactosides, car leur hydrolyse libère du glucose, du fructose et en quantité plus importante du galactose.

Il existe une relation entre le poids moléculaire (PM) de chaque ose ou oside injecté dans la colonne, le volume d'élution de chaque pic (Ve) et le volume exclu (Vo) : $\log PM = f\left(\frac{Ve}{Vo}\right)$. L'utilisation de cette relation nous a permis de déterminer le poids moléculaire des substances correspondant aux pics A, B et C (fig.6). Les substances rassemblées dans le pic A correspondent à un poids moléculaire d'environ 1400 soit 9 unités en chaîne. Les substances correspondant aux pics B et C ont un poids moléculaire d'environ 2300, soit 14-15 unités en chaîne ; ceci correspond à la limite de séparation de la colonne de Bio-Gel et à la limite de l'extraction des glucides par l'éthanol à 80 %.

Les pics 1, 2 et 3 correspondent à des substances de faible poids moléculaire car ils sont élués de la colonne après le saccharose, au bout de six heures.

Dans les graines entières, les pics 1, 2 et A ne sont décelables que dans la féverole.

Dans les cotylédons, seule la féverole montre la présence des pics 1 et 2 (fig. 2), le pic A est absent dans le pois ridé et le pois lisse ; seul, ce dernier possède le pic C (fig. 5).

La comparaison des chromatogrammes des téguments nous amène aux remarques suivantes : présence des pics 2 et 3 dans le pois ridé et le pois lisse et absence du pic 2 dans la féverole. Nous pensons que les pics 2 et 3 correspondent aux substances de faible poids moléculaire, mises en évidence par chromatographie sur couche

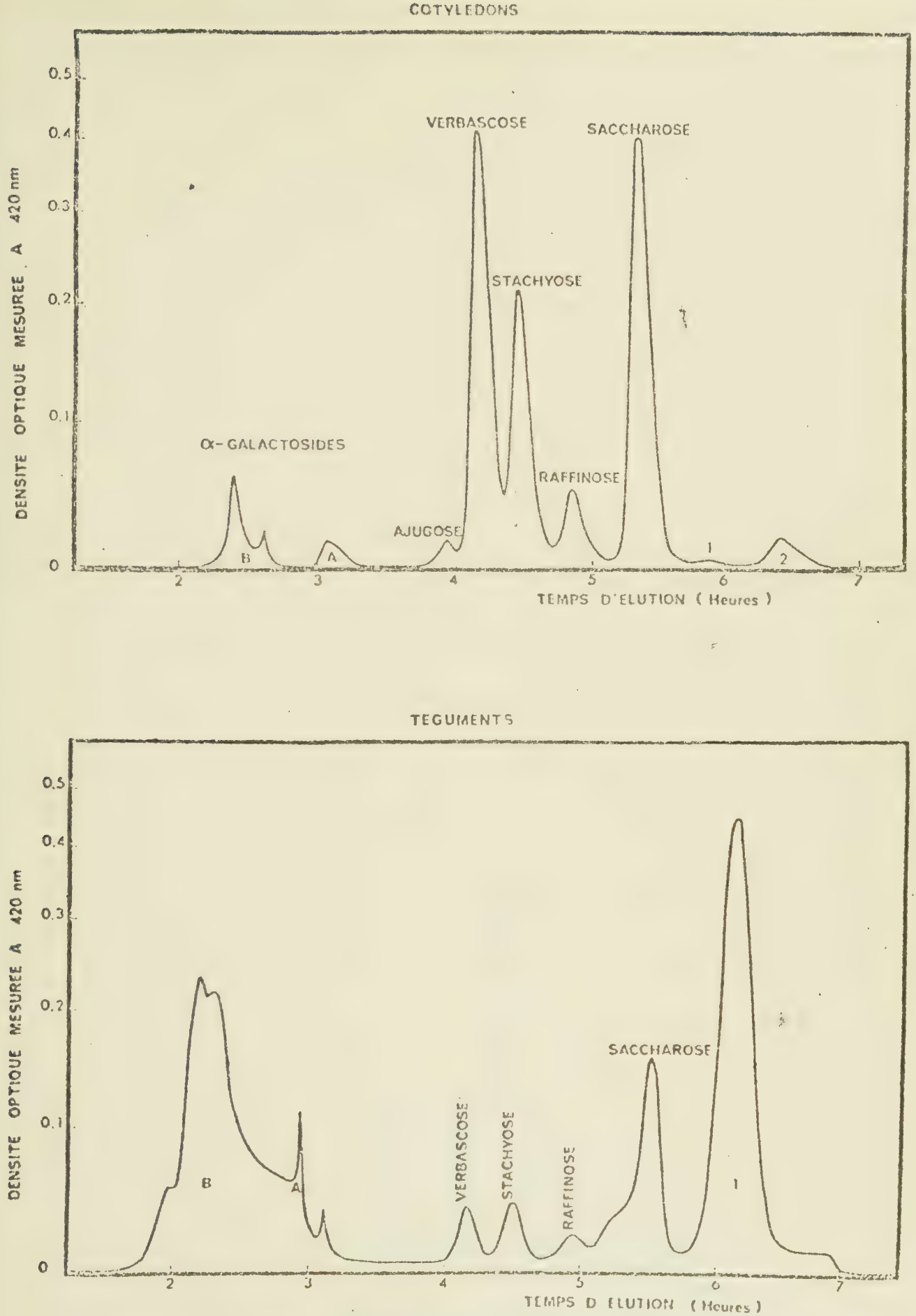
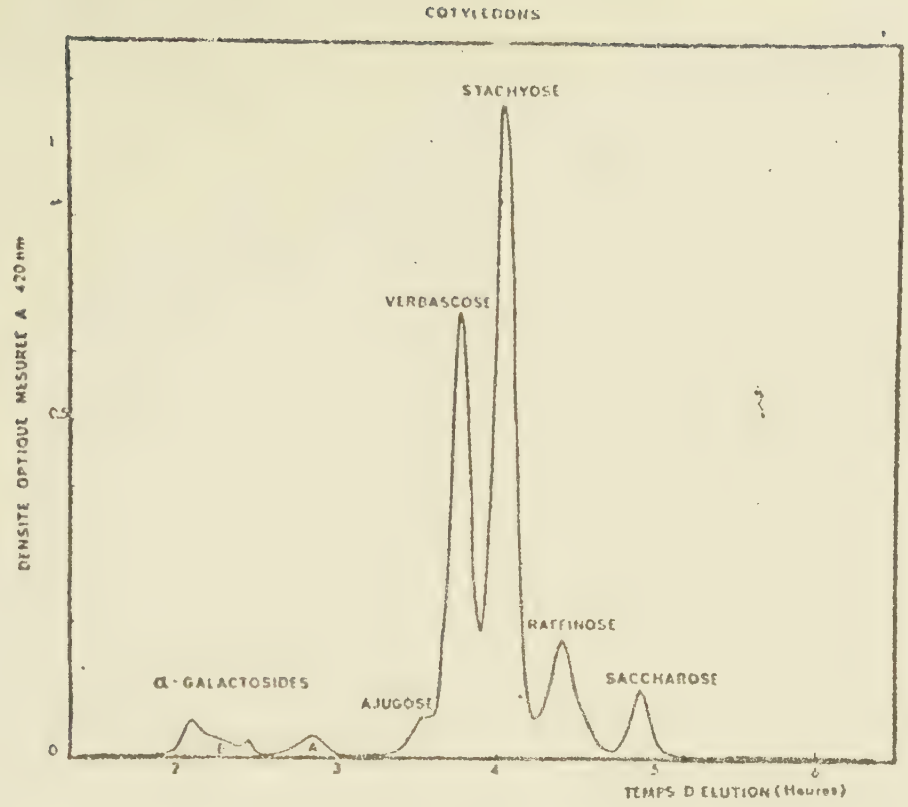


Figure 2 : Diagrammes d'élution des cotylédons et des téguments de féverole, après fractionnement sur colonne de Bio-Gel.



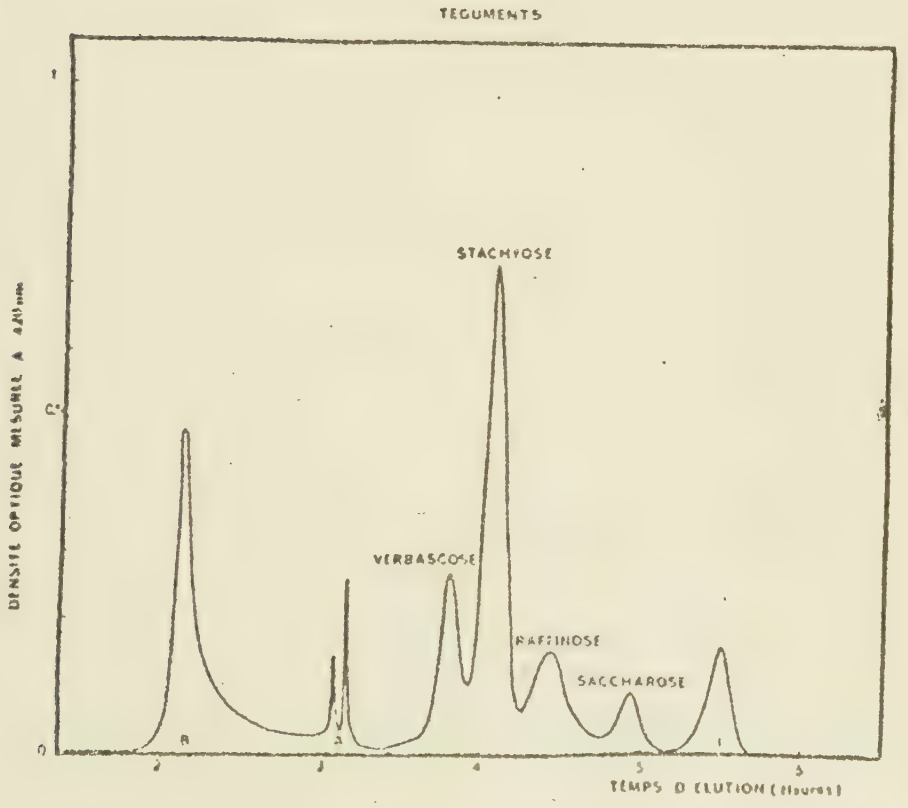
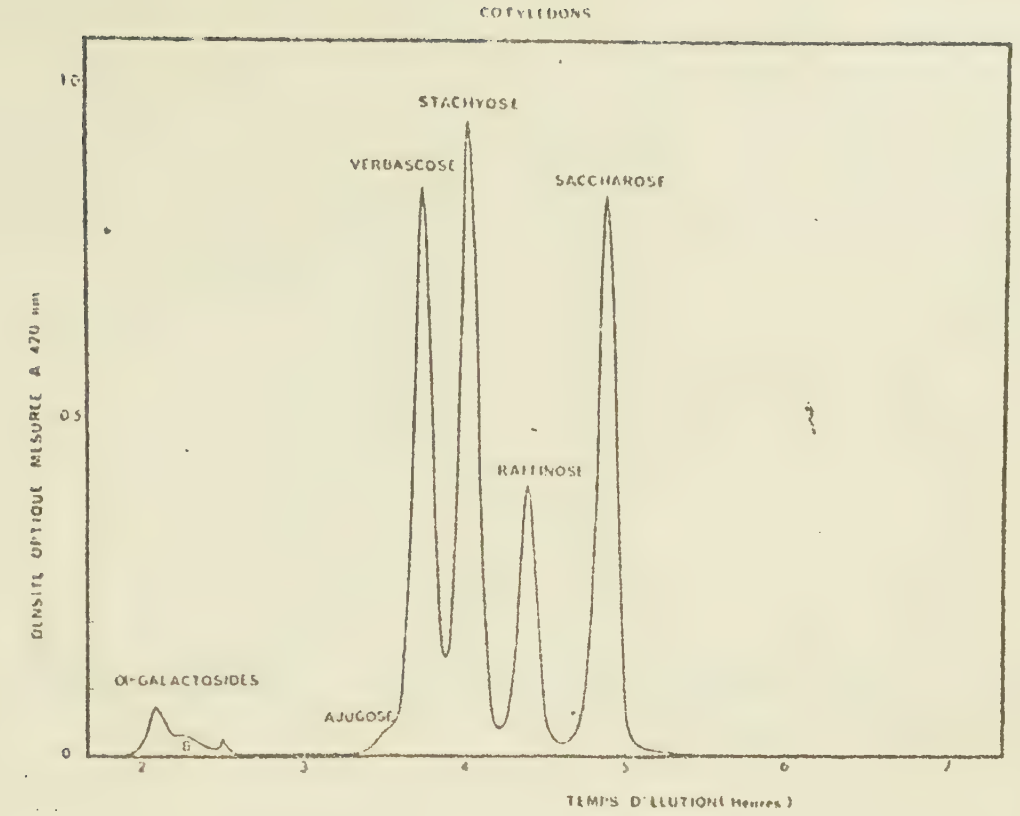


Figure 3 : Diagrammes d'élution des cotylédons et des téguments de lupin, après fractionnement sur colonne de Bio-Gel.



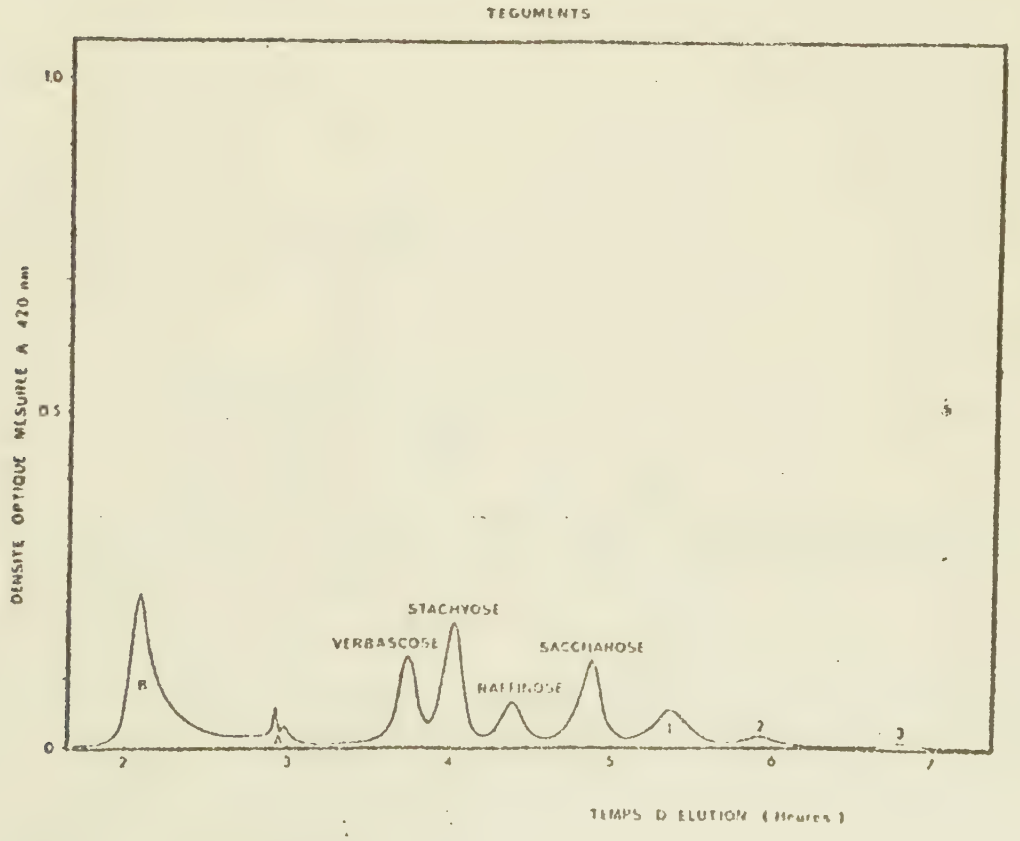


Figure 4 : Diagrammes d'élution des cotylédons et des téguments de pois ridé, après fractionnement sur colonne de Bio-Gel.

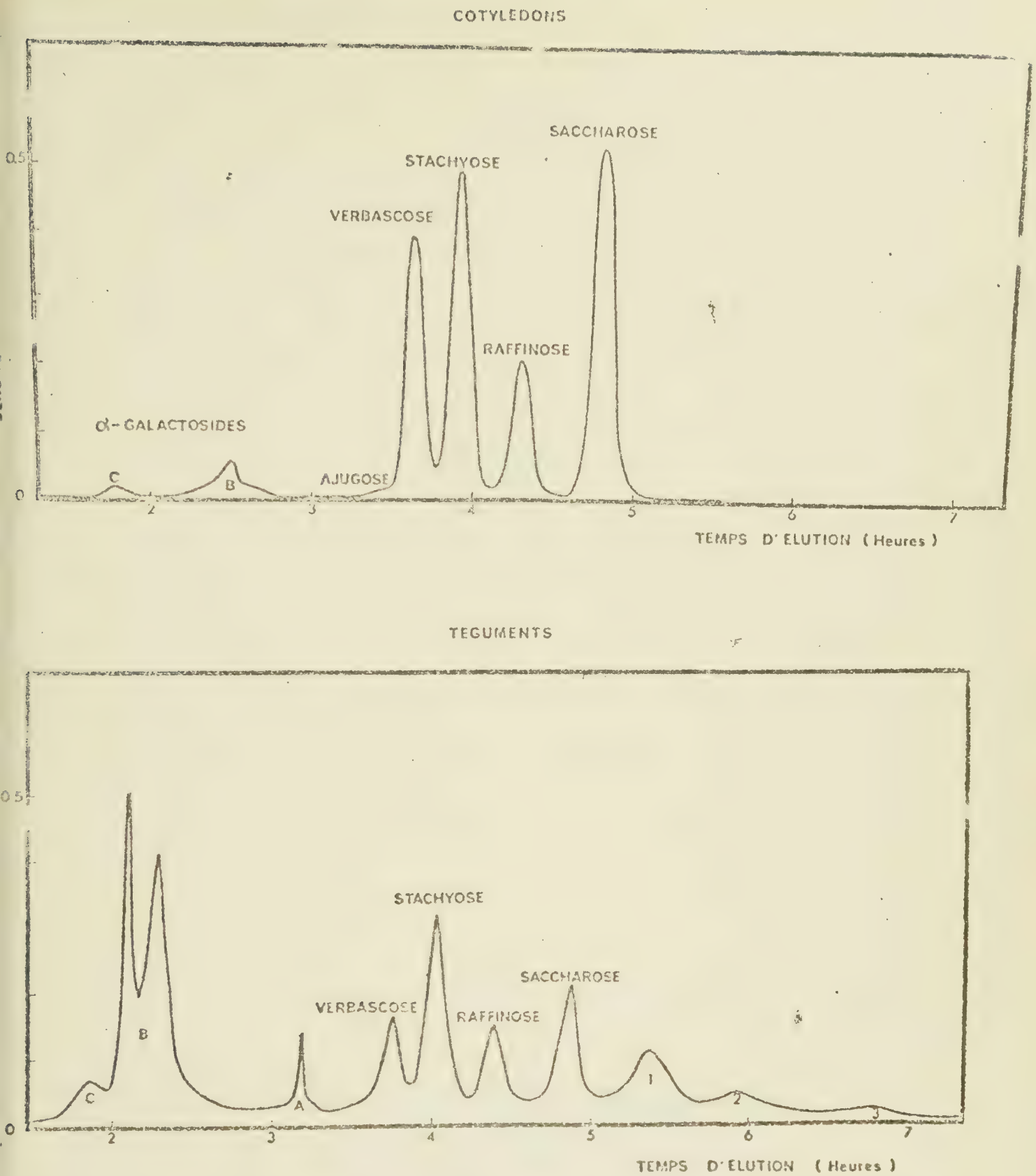


Figure 5 : Diagrammes d'élution des cotylédons et des téguments de pois lisse après fractionnement sur colonne de Bio-Gel.

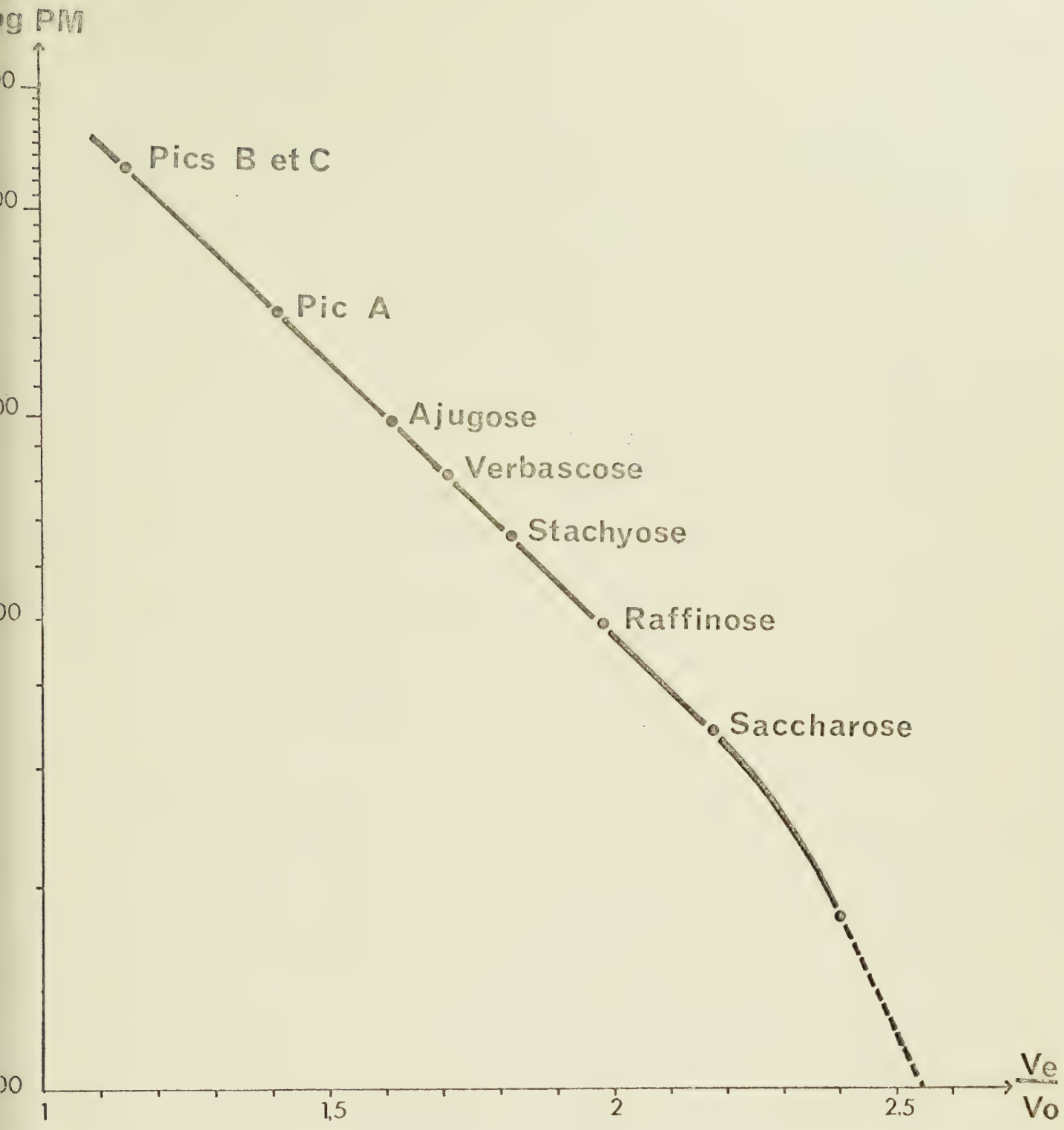


Fig 6: Courbe log PM = f($\frac{Ve}{Vo}$) obtenue après fractionnement sur colonne de Bio-Gel.

PM: Poids moléculaire des oses et osides séparés par le fractionnement

Ve: Volume d'élution de chaque pic

Vo: Volume d'exclusion de la colonne

mince (fig. 7) et de nature inconnue jusqu'à présent. En effet, elles ont des valeurs Rf comparables à celles du fructose, des pentoses et des sucres méthylés, mais leur couleur, après révélation, n'est pas identique à celle de ces témoins.

Le pic 1 devient important dans l'extrait des téguments de la féverole et apparait également dans les autres téguments. Un chromatogramme sur couche mince a permis de mettre en évidence que ce pic est composé de glucose, galactose et fructose. Il s'agit donc de produits de dégradation des α-galactosides, ce qui laisserait supposer l'existence d'une activité invertase et α-galactosidase dans les téguments ; ceci expliquerait également les traces de mélibiose observées par chromatographie sur couche mince.

Dans la graine entière et les cotylédons de féverole, le pic 1 ne renferme que du glucose.

Nous constatons l'absence d'ajugose et l'apparition, voir même une augmentation, des pics A et B dans tous les téguments ; le pic C est seulement décelé dans les téguments de pois lisse.

Quantification des glucides éthanolosolubles.

Avant de commenter les teneurs en oses et osides éthanolosolubles, il convient de discuter les problèmes que pose l'expression des résultats obtenus par le dosage des glucides totaux, soit à l'anthrone, soit à l'orcinol.

Le dosage direct des glucides éthanolosolubles totaux à l'orcinol ne donne pas les mêmes valeurs que celui à l'anthrone.

Lors du dosage à l'anthrone, à quantités égales et dans les mêmes conditions opératoires, le raffinose et le stachyose donnent des colorations dont les intensités sont inférieures à celles du glucose (fig. 8). Le phénomène inverse est observé lors du dosage à l'orcinol (fig. 9).

Par conséquent, les teneurs en glucides éthanolosolubles totaux, déterminées par l'orcinol sont toujours supérieures à celles déterminées par l'anthrone, lorsqu'elles sont exprimées en glucose.

Compte tenu de la prédominance des α-galactosides et en particulier du stachyose et du verbascose, dans les extraits éthanoliques des légumineuses, il nous a semblé préférable d'exprimer les résultats du dosage en direct à l'orcinol, en stachyose.

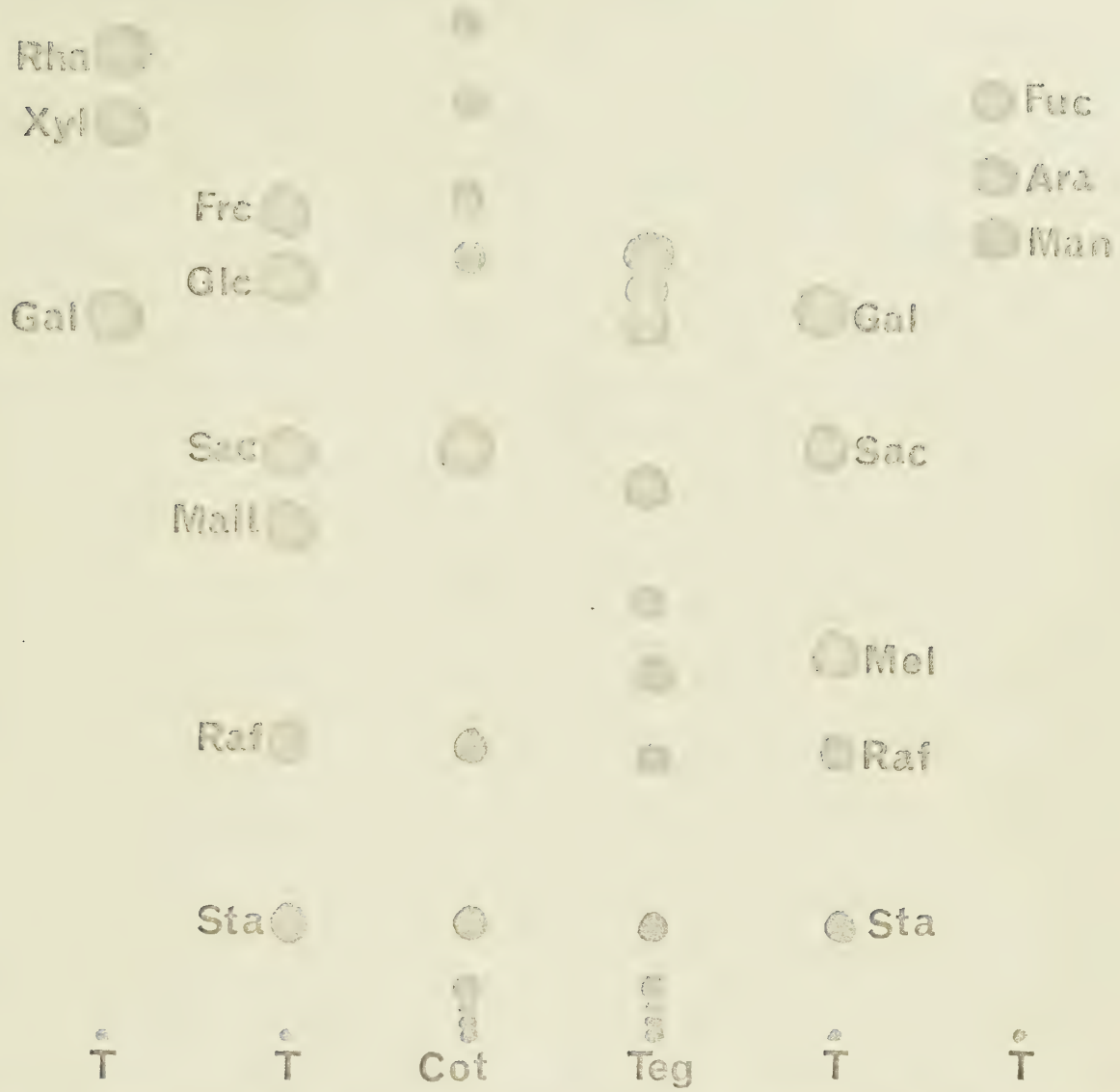


Fig 7:Chromatographie,sur plaque de gel de silice,des glucides éthanolosolubles des cotylédons et des téguments de féverole. 3 élutions par le solvant chloroforme-acide acétique-eau(44/47/3,v/v). Révèlation par pulvérisation du réactif à la diphénylamine aniline. Témoins:Arabinose[Ara],Fructose[Fru],Fucose[Fuc],Galactose[Gal], Glucose[Glc],Malltose[Malt],Mannose[Man],Mélibiose[Mel], Raffinose[Raf],Rhamnose[Rha],Saccharose[Sac], Stachyose[Sta], Xylose[Xyl].

Fig 8 : Courbes d'étalonnage, de différents oses et osides, obtenues par la méthode à l'anthrone.

[Densité optique mesurée à 625 nm]

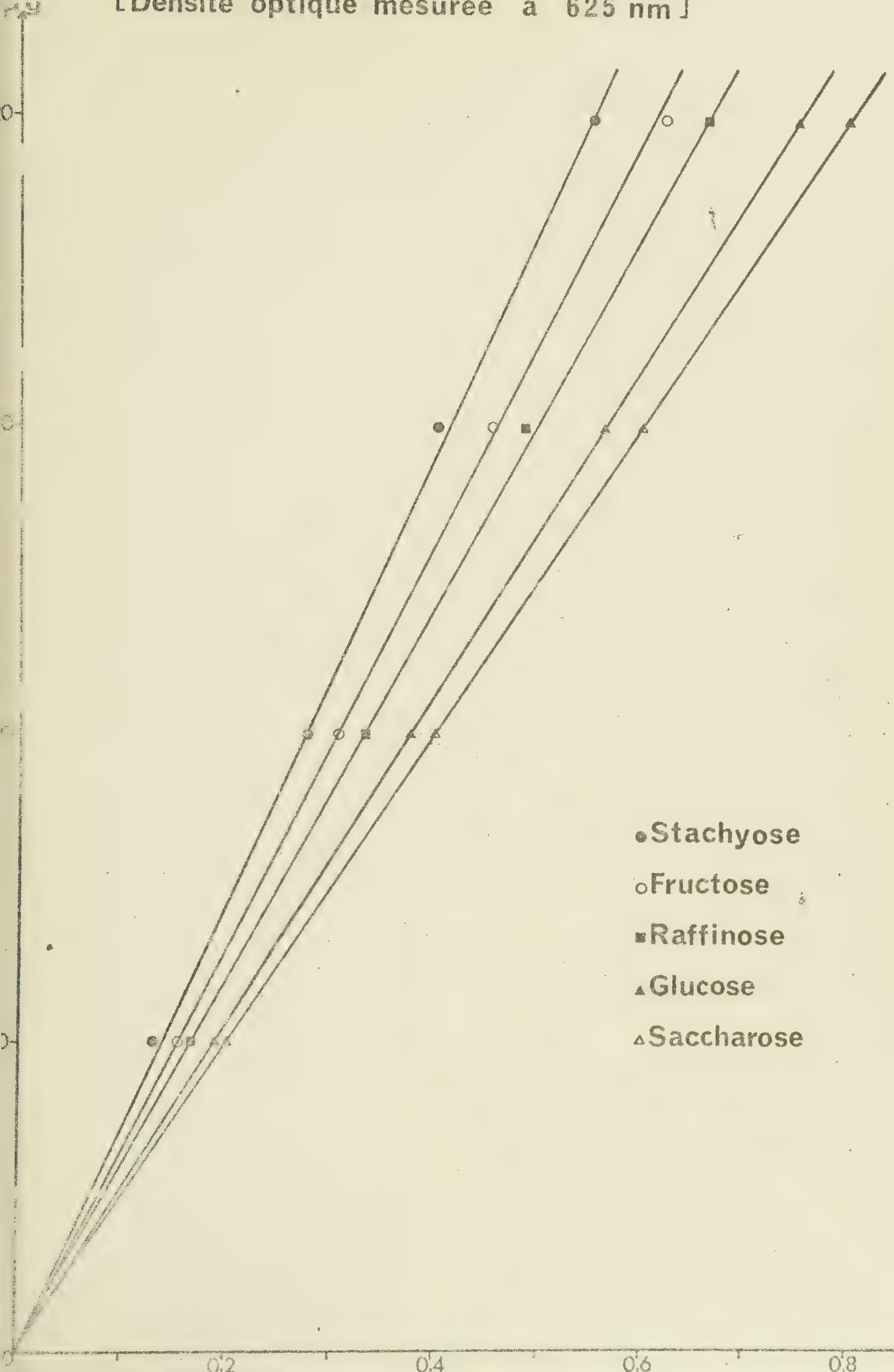
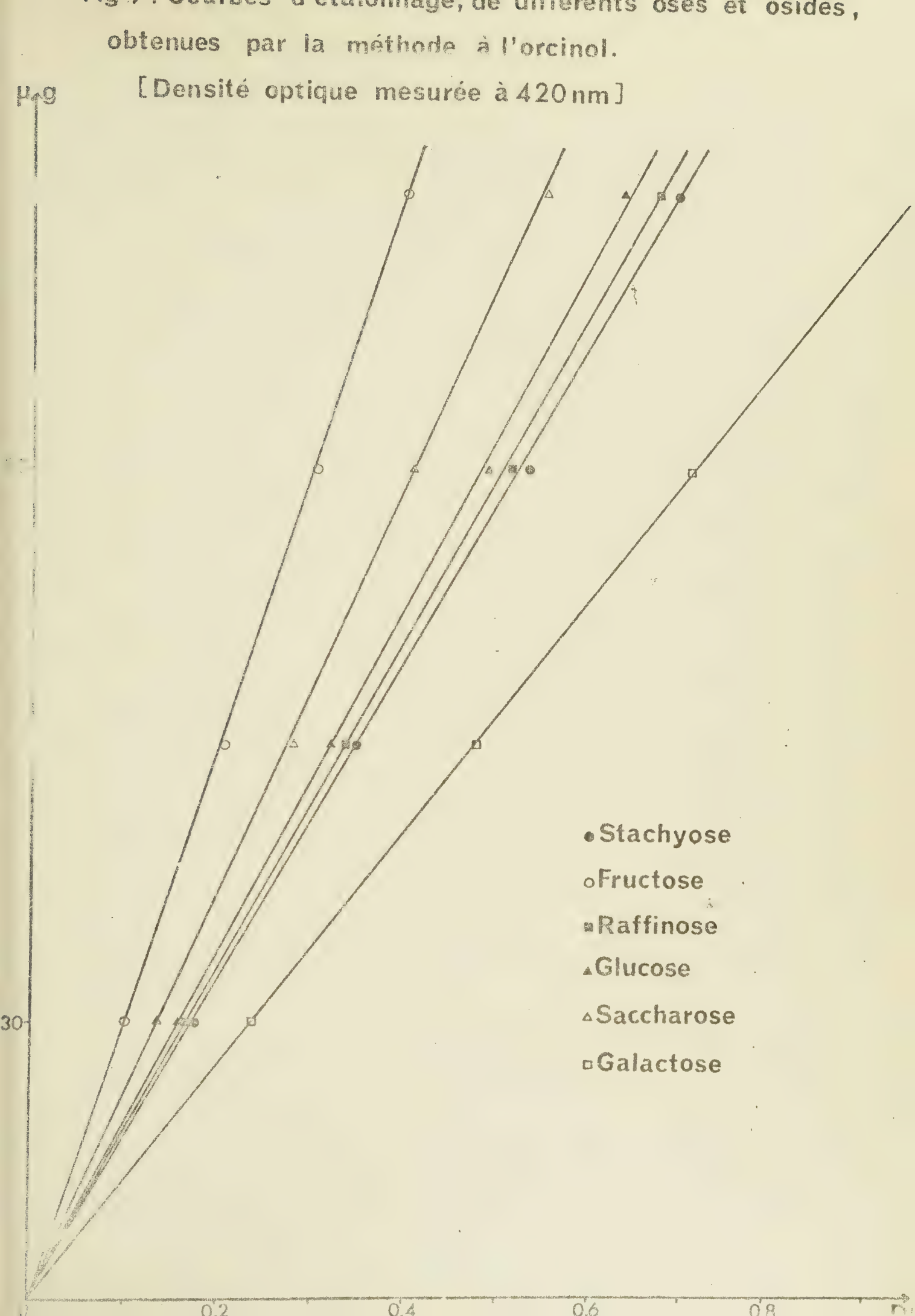


Fig 7 : Courbes d'étalonnage, de différents oses et osides, obtenues par la méthode à l'orcinol.

[Densité optique mesurée à 420 nm]



Une difficulté supplémentaire, quant à la quantification des résultats, réside dans le fait que les courbes d'étalonnage des oses et osides témoins (glucose, saccharose, raffinose, stachyose) après leur passage sur la colonne de Bio-Gel, sont différentes de celles obtenues après dosage à l'orcinol, en direct.

Une autre remarque concerne l'appréciation quantitative des pics A, B et C, correspondant aux α-galactosides de poids moléculaire élevé. Ces substances se trouvent dans le pic d'exclusion de la colonne qui peut présenter une allure pointue ou étalée, la prise en considération de leur densité optique conduirait à des résultats soit beaucoup trop élevés, soit beaucoup trop faibles. De ce fait, la teneur en α-galactosides de poids moléculaire élevé a été calculée en tenant compte de la surface des pics correspondants.

Toutes ces réflexions nous amènent à souligner que les résultats dont nous faisons état, par la suite, doivent être considérés avec une certaine prudence ; dans les meilleures conditions, la précision de cette méthode est de l'ordre de 10 %.

Les résultats relatifs à la teneur en oses et osides des cotylédons et téguments des graines de féverole, de lupin, de pois lisse et ridé sont rassemblés respectivement dans les tableaux IX, X, XI, XII.

Comme déjà indiqué auparavant, ces teneurs, exprimées en fonction de la substance sèche, peuvent être calculées à partir de la surface ou de la densité optique de chaque pic.

A l'exception du lupin, les deux méthodes donnent des résultats comparables. Ainsi nous avons indiqué le résultat d'une seule détermination, la surface en l'occurence, car elle permet de quantifier les α-galactosides de poids moléculaire élevé correspondant aux pics A, B et C.

. Dans les cotylédons de féverole (tableau IX), le verbascose (2,5 %) et le stachyose (1,7 %) sont les α-galactosides pondéralement les plus importants.

La teneur en saccharose (2,2 %) est comparable à celle obtenue par dosage enzymatique (2,48 %). Le raffinose et l'ajugose sont présents en plus faible quantité, leurs teneurs sont respectivement

Tableau IX : Teneurs en oses et osides éthanolosolubles, des cotylédons et des téguments de la féverole Bianka.
Résultats exprimés en p.100 de la substance sèche.

C O T Y L E D O N S

	Expression de la surface de chaque pic par rapport à la surface totale		p. 100 s.s. (surface)
	(Anthrone : 7,58 p.100)	(Orcinol 10,02 p.100)	
Pic 2	0,3	0,4	0,1
Pic 1	0,1	0,2	0,05
Saccharose	2,3	3,1	2,2
Raffinose	0,4	0,5	0,3
Stachyose	1,4	1,8	1,7
Verbascose	2,2	2,9	2,5
Ajugose	0,2	0,2	0,1
Pic A ($\overline{DP}$ = 9)	0,2	0,2	0,1
Pic B ($\overline{DP}$ ≃ 14-15)	0,5	0,6	0,2

Teneur en saccharose, obtenue par dosage enzymatique : 2,48%.

T E G U M E N T S

	Expression de la surface de chaque pic par rapport à la surface totale (anthrone = orcinol) 1,1 p.100	p.100 s.s. (surface)
Pic 1	0,4	0,6
Saccharose	0,2	0,3
Raffinose	0,04	0,06
Stachyose	0,05	0,05
Verbascose	0,04	0,04
Ajugose	-	-
Pic A ($\overline{DP}$ = 9)	0,03	0,03
Pic B ($\overline{DP}$ ≃ 14-15)	0,3	0,3

Teneur en saccharose, obtenue par dosage enzymatique : 0,21%.

Tableau X : Teneurs en oses et osides éthanolosolubles, des cotylédons et des téguments du lupin jaune Weiko.
Résultats exprimés en p.100 de la substance sèche.

C O T Y L E D O N S

	Expression de la surface de chaque pic par rapport à la surface totale		p.100 s.s. (Do)	p.100 s.s. (surface)
	(Anthrone : 13,48%)	(Orcinol:19,94%)		
Saccharose	0,6	0,9	1,3	1,5
Raffinose	1,4	2,0	1,6	2,3
Stachyose	6,1	9,1	7,2	8,1
Verbascose	3,9	5,8	4,9	5,2
Ajugose	0,7	1,0	0,5	0,9
Pic A ($\overline{DP}$ = 9)	0,3	0,5		0,4
Pic B ($\overline{DP}$ ≈ 14-15)	0,4	0,6		0,6

Teneur en saccharose, obtenue par dosage enzymatique : 1,13%%

T E G U M E N T S

	Expression de la surface de chaque pic par rapport à la surface totale		p.100 s.s. (surface)
	(Anthrone : 0,39%)	(Orcinol : 0,96%)	
Pic 1	0,04	0,1	0,1
Saccharose	0,02	0,05	0,06
Raffinose	0,05	0,1	0,1
Stachyose	0,1	0,3	0,2
Verbascose	0,05	0,1	0,1
Ajugose	-	-	-
Pic A ($\overline{DP}$ = 9)	0,02	0,04	0,03
Pic B ($\overline{DP}$ ≈ 14-15)	0,07	0,2	0,1

Teneur en saccharose, obtenue par voie enzymatique : 0,07%.

Tableau XI : Teneurs en oses et osides éthanolosolubles, des cotylédons et des téguments de pois ridé Lincoln.
Résultats exprimés en p.100 de la substance sèche.

C O T Y L E D O N S

	Expression de la surface de chaque pic par rapport à la surface totale		p.100 s.s. (surface)
	(Anthrone : 13,38%)	(Orcinol : 16,0%)	
Saccharose	3,6	4,3	4,7
Raffinose	1,6	2,0	2,5
Stachyose	4,0	4,8	4,7
Verbascose	3,6	4,30	4,2
Ajugose	0,2	0,2	0,2
Pic A ($\overline{DP}$ = 9)	0,03	0,03	0,04
Pic B ($\overline{DP} \simeq$ 14-15)	0,3	0,4	0,4

Teneur en saccharose, obtenue par dosage enzymatique : 4,38%.

T E G U M E N T S

	Expression de la surface de chaque pic par rapport à la surface totale		p.100 s.s. (surface)
	(Anthrone : 0,61%)	(Orcinol : 1,23%)	
Pic 2	0,02	0,03	0,02
Pic 1	0,06	0,1	0,07
Saccharose	0,09	0,2	0,1
Raffinose	0,05	0,1	0,05
Stachyose	0,1	0,2	0,08
Verbascose	0,08	0,2	0,06
Ajugose	-	-	-
Pic A ($\overline{DP}$ = 9)	0,02	0,04	0,01
Pic B ($\overline{DP} \simeq$ 14-15)	0,2	0,3	0,1

Teneur en saccharose, obtenue par dosage enzymatique : 0,11%.

Tableau XII : Teneurs en oses et osides éthanolosolubles, des cotylédons et des téguments de pois lisse Dicktrom.
Résultats exprimés en p.100 de la substance sèche.

C O T Y L E D O N S

	Expression de la surface de chaque pic par rapport à la surface totale		p.100 s.s. (surface)
	(Anthrone : 8,23%)	(Orcinol : 10,20%)	
Saccharose	2,3	2,9	3,4
Raffinose	1,0	1,2	1,2
Stachyose	2,3	2,9	2,8
Verbascose	1,7	2,2	2,1
Ajugose	0,1	0,1	0,1
Pic B ($\overline{DP} \simeq 14-15$)	0,7	0,8	0,8

Teneur en saccharose, obtenue par dosage enzymatique : 3,23%.

T E G U M E N T S

	Expression de la surface de chaque pic par rapport à la surface totale		p.100 s.s. (surface)
	(Anthrone : 0,37%)	(Orcinol : 0,7%)	
Pic 3	0,01	0,01	0,01
Pic 2	0,02	0,03	0,03
Pic 1	0,04	0,07	0,07
Saccharose	0,04	0,08	0,09
Raffinose	0,03	0,05	0,05
Stachyose	0,05	0,1	0,07
Verbascose	0,03	0,05	0,04
Ajugose	-	-	-
Pic A ($\overline{DP} = 9$)	0,01	0,01	0,01
Pic B ($\overline{DP} \simeq 14-15$)	0,1	0,2	0,2
Pic C ($\overline{DP} \simeq 14-15$)	0,02	0,04	0,03

Teneur en saccharose, obtenue par dosage enzymatique : 0,08%.

0,3 et 0,1 %. Il en est de même en ce qui concerne les substances de faible poids moléculaire et les α-galactosides de poids moléculaire plus élevé.

La comparaison de ces résultats avec ceux obtenus par l'expression de la surface de chaque pic, par rapport à la surface totale, indique quelques différences, surtout dans le cas du saccharose.

. Dans les téguments de féverole nous pouvons constater que la quantité des substances rassemblées dans le pic 1 et celle correspondant aux pics A et B, est relativement élevée. Les teneurs en α-galactosides de poids moléculaire élevé sont de l'ordre de 0,3 % dans les téguments, comme dans les cotylédons, alors que la teneur en glucides éthanolosolubles est respectivement 1 % et 10 %.

Les pics,obtenus après fractionnement sur colonne de Bio-Gel, des extraits éthanoliques des cotylédons de lupin, ne sont pas symétriques et insuffisamment séparés (fig. 3). Il en résulte que l'expression des résultats, en p.100 de la substance sèche, par rapport à la densité optique ou à la surface de chaque pic, donne des valeurs différentes. Celle calculée par rapport à la surface semble être la meilleure.

Les cotylédons de lupin sont extrêmement riches en stachyose et en verbascose, représentant au moins 70 % du total (tableau X). Ici, l'expression des résultats du dosage à l'orcinol, en stachyose, semble être particulièrement justifiée.

Par ailleurs, nous constatons que cette graine est aussi nettement plus riche en raffinose et en ajugose que la féverole, ceci est vrai également en ce qui concerne les substances de poids moléculaire élevé.

Les mêmes observations, formulées dans le cas de la féverole doivent être répétées ici, à savoir que l'expression de la surface de chaque pic par rapport à la surface totale aboutit à des valeurs qui sont relativement éloignées de celles obtenues en exprimant la surface de chaque pic par rapport aux courbes d'étalonnage correspondantes.

. Les cotylédons de pois ridé sont les plus riches en saccharose et en raffinose, les teneurs sont respectivement 4,6 et 2,5%. Les teneurs des autres galactosides sont intermédiaires entre celles des cotylédons de féverole et de lupin : 4,7% de stachyose, 4,2% de verbascose et 0,2% d'ajugose. (tableau XI).

. Dans les téguments du pois ridé, les teneurs en oses et osides sont très faibles, comme nous l'avons déjà observé dans les autres cas. Ici encore, les substances rassemblées dans les pics A et B sont proportionnellement plus importantes que dans les cotylédons.

Contrairement aux observations précédentes, les valeurs obtenues par rapport aux courbes d'étalonnage et celles obtenues à partir de la surface de chaque pic, par rapport à la surface totale, sont relativement proches.

. Dans les cotylédons du pois lisse le stachyose (2,8%) et le verbascose (2,1%) constituent environ la moitié des oses et osides. Les teneurs en saccharose et en raffinose sont respectivement de 3,4% et de 1,2%. (tableau XII).

. Les téguments de pois lisse, tout comme les autres, ne renferment que de très faibles quantités de glucides éthanolosolubles.

Il n'est pas facile de comparer nos résultats avec ceux d'autres auteurs. En effet, à notre connaissance, aucune étude sur cette fraction des α-galactosides n'a été réalisée au moyen de la chromatographie sur gel. Par contre, plusieurs auteurs ont rapporté des résultats sur les teneurs en oses et osides de diverses graines de légumineuses, obtenus par chromatographie sur papier. (TAUFEL et al., 1960. NIGAM et GIRI, 1961. TANUSI et al., 1972. CERNING et al., 1975. LINEBACK et KE, 1975).

Tous ces chercheurs s'accordent, généralement, pour trouver, dans la féverole, une teneur plus élevée en verbascose qu'en stachyose, alors que c'est l'inverse dans les autres graines. Le raffinose est toujours présent en plus faible quantité, le saccharose représente 20 à 30% des glucides éthanolosolubles de ces graines. Nos résultats sont en parfait accord avec ces observations.

Par ailleurs, nos résultats relatifs aux graines de pois ridé indiquent une composition en α-galactosides comparable à celle des autres graines, à savoir qu'il existe une prédominance de stachyose et de verbascose.

De plus, notre étude fait apparaitre également que tous les oses et osides sont principalement localisés dans les cotylédons.

La méthode de fractionnement sur colonne de Bio-Gel a permis de mettre en évidence l'existence d'α-galactosides de $\overline{DP} = 9$ et de $\overline{DP} \simeq 14\text{-}15$. Des α-galactosides de poids moléculaire élevé ont été identifiés dans d'autres plantes (HATTORI, 1958 ; TÄUFEL et al., 1960) mais leur présence dans les graines de légumineuses n'a jamais été démontrée auparavant. Il convient aussi de formuler quelques remarques concernant les différents modes d'expression des résultats obtenus, après fractionnement sur colonne de Bio-Gel.

Nous avons, en effet, tenté de calculer des valeurs absolues à partir du profil d'élution

$$\frac{\text{Surface de chaque pic x teneur en glucides éthanolosolubles totaux}}{\text{Surface totale des pics}}$$

Ce mode de calcul permettrait d'obtenir des résultats plus rapidement, sans établir à chaque expérience des courbes d'étalonnage, à partir de témoins purs.

Toutefois, la comparaison des valeurs ainsi calculées avec celles résultant de l'expression de la surface de chaque pic par rapport à des courbes d'étalonnage a montré des discordances considérables dans le cas de la féverole et du lupin, les différences pouvant aller jusqu'à 60%. Par contre, ces deux modes d'expression sont comparables dans le cas du pois ridé et du pois lisse, puisque les différences entre les résultats sont de l'ordre de 15 à 20%. Toutefois, il n'est pas possible, pour l'instant, de tirer des conclusions de ces observations car le nombre d'échantillons étudiés, dans une même espèce, est trop limité.

Un autre problème, beaucoup plus important, qui se pose dans l'étude des α-galactosides de ces légumineuses, concerne l'absence de substances de référence. En fait, les méthodes les plus modernes

pourront seulement aboutir à des résultats d'une valeur absolue lorsque les α-galactosides tels que le verbascose et l'ajugose seront disponibles à l'état pur.

Dans la dernière partie de notre travail, nous avons étudié les polyosides de structure et en particulier les hémicelluloses. Pour mieux connaître leur nature, leur composition et leur répartition entre les différents éléments histologiques de la graine, les cotylédons et les téguments ont été soumis à des hydrolyses successives et les hydrolysats obtenus ont été analysés tant sur le plan qualitatif que quantitatif.

4 - GLUCIDES HYDRO ET ACIDOSOLUBLES.

Après élimination des glucides éthanolosolubles, nous avons obtenu une fraction glucidique solubilisée dans le filtrat de l'attaque par la glucoamylase, que nous avons appelée "hydrosoluble" et un résidu insoluble (résidu II) que nous avons soumis à des hydrolyses acides successives.

Excepté l'amidon, pour lequel nous avons déjà présenté et commenté les résultats, dans le premier chapitre, les glucides hydro et acidosolubles sont des polyosides de structure, que nous allons étudier dans cette partie.

4.1 - METHODES UTILISEES.

4.1.1 - Glucides hydrosolubles.

Mises à part les quantités importantes de glucose provenant de l'hydrolyse de l'amidon, le filtrat de l'attaque par la glucoamylase renferme des hémicelluloses et des "polymères de glucose , non cellulosiques" que nous appelerons désormais glucanes solubles.

Les hémicelluloses hydrosolubles sont dosées en tant que "générateurs de furfural" ; les résultats sont exprimés en xylose.

Les glucanes hydrosolubles sont dosés de la façon suivante : le filtrat de l'attaque par la glucoamylase est soumis à une hydrolyse ménagée par l'acide chlorhydrique (milieu 0,7 N). Après neutralisation, le glucose libéré est dosé par la méthode à la glucose-oxydase, déduction faite du glucose provenant de l'amidon.

4.1.2 - Glucides acidosolubles.

Comme l'indique la figure 1, l'acide dilué (HCl 0,7N) a hydrolysé des matières pectiques, des hémicelluloses et des glucanes. L'acide concentré (H_2SO_4 72% à froid, 0,78 N à 100°C) a hydrolysé la cellulose et la fraction des hémicelluloses, la plus difficilement attaquable.

Les matières pectiques ont été dosées directement dans l'hydrolysat de l'acide dilué. La méthode employée est celle de Mc COMB et Mc CREADY (1952). Chauffés en présence d'acide sulfurique concentré, les acides hexuroniques simples ou polymérisés sont hydrolysés puis dégradés en oxyméthylfurfural qui réagit avec le carbazol en donnant une coloration rose dont le maximum d'absorption se situe à 530 nm. L'intensité de la coloration suit la loi de BEER-LAMBERT pour des quantités d'acides uroniques comprises entre 10 et 50 µg. Les résultats sont exprimés par rapport à une gamme d'acide galacturonique.

Les autres déterminations ont été effectuées après neutralisation des filtrats sur résine Duolite A 102 D. La méthode à la glucose-oxydase permet de doser le glucose des glucanes dans le filtrat neutralisé provenant de l'hydrolyse par l'acide dilué et le glucose de la cellulose dans le filtrat neutralisé obtenu après l'action de l'acide concentré.

La méthode de NELSON (1944), adaptée par MARAIS (1966), permet le dosage des glucides réducteurs : le groupement réducteur des oses réduit les ions cuivriques en ions cuivreux qui réagissent avec le réactif arsénio-molybdique en donnant une coloration bleu-verte dont la densité optique est mesurée à 520 nm.

L'intensité de la coloration est proportionnelle à la quantité de glucides réducteurs entre 0 et 150 µg. La reproductibilité de la méthode est de l'ordre de 1,5%. La différence entre la teneur en sucres réducteurs, exprimée en glucose, et la teneur en glucose (teneur en β-glucanes ou en cellulose, selon l'hydrolysat) permet de calculer la teneur en hémicelluloses solubles dans l'acide dilué et dans l'acide concentré. L'expression de cette teneur en xylose ou en glucose ne modifie pas le résultat analytique puisque hexoses et pentoses donnent, à quantité égale, les mêmes densités optiques, dans les conditions opératoires décrites.

4.2 - RESULTATS ET DISCUSSION.

4.2.1 - Matières pectiques.

Les résultats concernant les matières pectiques figurent dans le tableau XIII. Les teneurs sont proches les unes des autres dans tous les téguments ; elles vont de 3,7% (pois lisse) à 4,5% (féverole), soit 4,1% en moyenne. Dans tous les cotylédons étudiés on en trouve moins de 1%.

4.2.2 - Hémicelluloses.

Les hémicelluloses sont des glucides complexes ; ils se différencient par leur solubilité dans l'eau et dans l'acide à concentration variable . Chacune de ces fractions est constituée de pentoses, avec généralement une prédominance de xylose, accompagnés de constituants mineurs tels que le glucose, le galactose, les sucres méthylés et les acides uroniques. De plus, leur structure, qui semble différer selon l'espèce considérée, est très peu connue jusqu'à l'heure actuelle. (tableau XIV).

Le schéma de fractionnement adopté nous a permis de doser quantitativement chacune des fractions hémicellulosiques et de caractériser les oses qui constituent ces différentes fractions.

Caractérisation qualitative.

Il convient de souligner qu'il n'est malheureusement pas possible de rendre l'image exacte des chromatogrammes originaux.

Tableau XIII : Teneurs en matières pectiques acidosolubles des téguments, des cotylédons et de la graine entière des légumineuses.

Résultats exprimés en p.100 de la substance sèche.

	TEGUMENTS	COTYLEDONS	GRAINE ENTIERE	GRAINE ENTIERE RECONSTITUEE
Féverole	4,5	0,2	0,7	0,75
Lupin	4,1	0,4	1,5	1,3
Pois ridé	4,1	0,7	1,1	1,1
Pois lisse	3,7	0,3	0,65	0,6

Tableau XIV : Composition des hémicelluloses des graines de légumineuses.

ESPECE	POLYMERE	OSES CONSTITUTIFS	STRUCTURE	REFERENCES
Vicia faba		D Xyl - D Gal - D Glu - L Fuc		KAWAMURA et NARASAKI (1958)
		D Xyl - L Ara - D Glu - D Gal - L Rha		CERNING et al. (1975)
Pisum sativum	Arabinoxylane A	D Xyl - L Ara (5:1) D Gal - D Ur.	Chaîne de β 1-4 D - xylose. Branchements en 1-3 d'unités L Arabinose	BANERJI et RAO (1963)
	Arabinoxylane B	D Xyl - L Ara (15:1)	Chaîne de β 1-4 D - xylose. Branchements en 1-3 d'unités L - Arabinose	BANERJI et RAO (1963)
Lupinus luteus		D Gal - L Ara - D Galur - L Rha - D Xyl		TOMODA et KITAMURA (1967)

En effet, les légères nuances de coloration, ainsi que de faibles traces de certains composants visibles immédiatement après la révélation, sont difficiles à reproduire. Cependant, nous serons amenés à faire état de ces observations au cours de la discussion car elles permettent de montrer certains détails.

Etant donné que tous les chromatogrammes révèlent la présence des mêmes pentoses, hexoses et sucres méthylés et que seule, leur quantité respective semble varier, nous ne montrons ici que le chromatogramme de la graine de lupin à titre d'exemple (fig. 10).

L'hydrolyse ménagée libère, dans tous les cas, glucose, galactose, xylose, arabinose et rhamnose. Le xylose est toujours le constituant prépondérant, le galactose apparait en quantité plus faible et le rhamnose est observé à l'état de traces. L'arabinose est présent en faible quantité dans la féverole et le lupin et à l'état de traces dans les pois ridé et lisse. Les quantités de glucose varient dans les différents hydrolysats ; dans le lupin et le pois lisse on n'en observe que de faibles quantités, alors que dans la féverole et le pois ridé les taches de glucose ont une intensité plus importante. Il n'est pas possible de déterminer, sans ambiguité, l'origine de ce glucose. Il pourrait provenir de l'hydrolyse des hémicelluloses, ou il peut être présent en tant que constituant mineur. Une partie de ce glucose pourrait être le produit de dégradation de glucanes, dont la présence, dans les graines de féverole, a déjà été observée par PRITCHARD et al (1973).

Dans les hydrolysats de l'acide concentré, le glucose, produit de dégradation de la cellulose, est le constituant le plus abondant. L'hydrolyse de la cellulose peut être considérée comme complète car le cellobiose n'apparait qu'à l'état de traces. Le xylose est observé dans tous les cas, en faible quantité, le rhamnose est présent à l'état de traces.

Les résultats obtenus, concernant la constitution des hémicelluloses de féverole confirment ceux de CERNING et al. (1975). Contrairement à KAWAMURA et NARASAKI (1958), nous n'avons pu déceler le fucose.

Dans les pois, nous avons mis en évidence xylose, galactose, rhamnose, arabinose et glucose. Ces résultats sont à rapprocher

T | Hcl 15 µg | H_2SO_4 15 µg | T | Hcl 30 µg | H_2SO_4 30 µg | T

Fig 10 : Chromatographie, sur plaque de gel de silice, des hydrolysats acides des téguments de lupin.

3 éluants par le solvant chloroforme-acide acétique-eau (44/47/3, v/v). Révélation par pulvérisation du réactif à la diphénylamine aniline.

Témoins : Arabinose [ara], Cellobiose [cel], Fucose [fuc], Galactose [gal], Glucose [glc], Mannose [man], Rhamnose [rha], Ribose [rib], Xylose [xyl].
(15 µg)

de ceux de BANERJI et RAO (1963) qui trouvent du xylose, de l'arabinose, des traces d'acides uroniques et de galactose. Comme ces chercheurs, nous avons constaté la prépondérance du xylose. Aucun auteur, à notre connaissance, n'a fait mention de rhamnose dans ces graines.

Nos résultats, concernant les hémicelluloses des graines de lupin, sont en bon accord avec ceux de TOMODA et KITAMURA (1967).

Nous savons par le dosage quantitatif que tous les téguments étudiés contiennent une quantité non négligeable d'acide galacturonique. Nous n'avons pas pu les observer sur les chromatogrammes, étant donné qu'ils ont été retenus sur la résine utilisée pour la neutralisation. Il parait très vraisemblable que ces acide uroniques soient associés, au moins en partie, aux hémicelluloses solubles dans l'acide dilué.

Il n'est pas exclu que d'autres constituants mineurs, pouvant exister dans les hémicelluloses, n'aient pas pu être décelés dans nos conditions opératoires.

Résultats quantitatifs.

Les résultats concernant les fractions hydrosolubles et acidosolubles des hémicelluloses et des "polymères de glucose, non cellulosiques" des graines de légumineuses étudiées sont rapportés dans les tableaux X V, X VI, X VII, X VIII.

Dans tous les cotylédons, la fraction d'hémicelluloses hydrosolubles est prépondérante puisqu'elle représente 77% dans la féverole (tableau X V), 73% dans le lupin (tableau X VI), 71 % dans le pois ridé (tableau X VII) et 84% dans le pois lisse (tableau X VIII), des hémicelluloses totales.

Les hémicelluloses solubles dans l'acide dilué représentent de 12% (dans le pois lisse) à 26% (dans le pois ridé) des hémicelluloses totales. Par contre, les hémicelluloses solubles dans l'acide concentré, sont présentes en faible quantité dans cette partie de la graine (4 à 7% des hémicelluloses totales). Cette fraction semble être associée à la cellulose.

Tableau XV : Hémicelluloses, générateurs de furfural totaux et "polymères de glucose non cellulosiques" de la féverole Bianka. Résultats exprimés en p.100 de la substance sèche.

	COTYLEDONS	TEGUMENTS	GRAINE ENTIERE
Hémicelluloses Hydrosolubles *	1,9	8,4	2,2
Hémicelluloses solubles dans l'acide dilué **	0,4	8,2	1,4
Hémicelluloses solubles dans l'acide concentré **	0,2	7,6	0,4
Hémicelluloses totales	2,5	24,2	4,0
Générateurs de furfural totaux	2,85	21,3	4,7
"Polymères de glucose non cellulosiques" Hydrosolubles	0,1	1,6	0,6
Solubles dans l'acide dilué	0,2	1,4	0,3
Polymères de glucose non cellulosiques totaux	0,3	3,0	0,9

* Exprimées en générateurs de furfural.

** Exprimées en sucres réducteurs.

Tableau XVI : Hémicelluloses, générateurs de furfural totaux et "polymères de glucose non cellulosiques" du lupin jaune Weiko III. Résultats exprimés en p.100 de la substance sèche.

	COTYLEDONS	TEGUMENTS	GRAINE ENTIERE
Hémicelluloses hydrosolubles*	2,9	8,7	4,6
Hémicelluloses solubles dans l'acide dilué **	0,8	12,9	1,8
Hémicelluloses solubles** dans l'acide concentré	0,3	6,8	3,5
Hémicelluloses totales	4,0	28,4	9,9
Générateurs de furfural totaux	4,45	28,2	10,5
"Polymères de glucose non cellulosiques"			
Hydrosolubles	0,7	1,2	0,15
Solubles dans l'acide dilué	0,3	1,2	0,15
"Polymères de glucose non cellulosiques" totaux	1,0	2,4	0,3

* Exprimées en générateurs de furfural.

** Exprimées en sucres réducteurs.

Tableau XVII : Hémicelluloses, générateurs de furfural totaux et "polymères de glucose non cellulosiques" du pois ridé Lincoln.
Résultats exprimés en p.100 de substance sèche.

	COTYLEDONS	TEGUMENTS	GRAINE ENTIERE
Hémicelluloses hydrosolubles *	2,5	9,5	3,55
Hémicelluloses solubles dans l'acide dilué **	0,9	8,1	1,9
Hémicelluloses solubles dans l'acide concentré**	0,1	7,2	1,2
Hémicelluloses totales	3,5	24,8	6,65
Générateurs de furfural totaux	4,8	26,3	6,35
"Polymères de glucose non cellulosiques"			
Hydrosolubles	1,4	1,5	0,9
Solubles dans l'acide dilué	1,7	1,2	1,1
"Polymères de glucose non cellulosiques" totaux	3,1	2,7	2,0

* Exprimés en générateurs de furfural.

** Exprimés en sucres réducteurs.

Tableau XVIII : Hémicelluloses, générateurs de furfural totaux et "polymères de glucose non cellulosiques" du pois lisse Dicktrom. Résultats exprimés en p.100 de la substance sèche.

	COTYLEDONS	TEGUMENTS	GRAINE ENTIERE
Hémicelluloses Hydrosolubles*	2,5	10,3	3,3
Hémicelluloses solubles dans l'acide dilué **	0,35	9,2	0,8
Hémicelluloses solubles dans l'acide concentré**	0,1	8,0	1,0
Hémicelluloses totales	2,95	27,5	5,1
Générateurs de furfural totaux	3,5	25,3	4,9
"Polymères de glucose non cellulosiques"			
Hydrosolubles	0	0,9	0,6
Solubles dans l'acide dilué	0,2	1,2	0,2
"Polymères de glucose non cellulosiques" totaux	0,2	2,1	0,8

* Exprimées en générateurs de furfural.

** Exprimées en sucres réducteurs.

Dans les téguments, la fraction hydrosoluble reste la plus importante, excepté pour le lupin, mais en proportion environ deux fois plus faible que dans les cotylédons. En effet, les valeurs de 8,4 et 8,7% d'hémicelluloses dosées dans la féverole (tableau X V) et dans le lupin (tableau X VI) représentent respectivement 35 et 31 % de la fraction polyosidique totale.

Quant aux pois lisse et ridé, les teneurs sont un peu supérieures ; elles sont respectivement 9,5 et 10,3 % (tableau X VII et X VIII) et constituent environ 38% du total dans les deux cas.

A l'exception du lupin, la quantité d'hémicelluloses solubles dans l'acide dilué, est du même ordre de grandeur que celle des hémicelluloses hydrosolubles et représente un tiers des hémicelluloses totales. La teneur de 12,9% en hémicelluloses dosées, après hydrolyse ménagée, dans les téguments du lupin, constitue environ la moitié de la fraction hémicellulosique totale.

Dans tous les téguments 7 à 8% d'hémicelluloses sont dosées après hydrolyse par l'acide concentré. Cette fraction entre pour 25 à 30% dans la composition en hémicelluloses totales.

Dans les graines entières, exceptée la graine de pois lisse, la quantité d'hémicelluloses hydrosolubles correspond à environ la moitié, celle dosée après hydrolyse ménagée à 30 à 35% des hémicelluloses totales.

3,3% d'hémicelluloses hydrosolubles, soit 65% du total, sont déterminées dans la graine entière de pois lisse (tableau X VIII). Comparée aux valeurs obtenues dans les autres graines, la teneur en hémicelluloses solubles dans l'acide concentré, est la plus élevée (3,5%) dans les graines de lupin (tableau X VI) et compte pour 35% dans la fraction hémicellulosique totale.

Les graines entières de féverole et de pois lisse ont les teneurs les plus faibles en hémicelluloses totales, elles sont respectivement de 4 et 5,1 % (tableau X V et X VIII). Le pois ridé contient 6,6% d'hémicelluloses (tableau X VII), mais la graine de lupin est, de loin, la graine la plus riche en ces polyosides puisqu'elle en renferme 9,9% (tableau X VI).

La comparaison des teneurs en hémicelluloses totales et en générateurs de furfural totaux, nous amène à faire les remarques suivantes :

- Dans les graines entières et dans les cotylédons, les teneurs en générateurs de furfural totaux sont supérieures à la somme des teneurs en hémicelluloses hydrosolubles et acido-solubles. A l'exception de la graine entière de féverole, où l'écart entre ces deux déterminations atteint 15% environ (tableau X V), la différence est de 4 à 6%, dans les autres graines. Cette différence va jusqu'à 15% dans les cotylédons autres que ceux de pois ridé.

- Dans les téguments de lupin (tableau X VI), les deux résultats sont très proches. Dans les téguments de féverole et de pois lisse, la teneur en hémicelluloses totales est respectivement de 13 et de 9% plus élevée que celle en générateurs de furfural totaux. Par contre, nous observons le phénomène inverse dans les téguments de pois ridé (tableau X VII) , à savoir que la teneur en générateurs de furfural totaux est de 6% supérieure à la teneur en hémicelluloses totales.

En somme, exception faite des cotylédons de pois ridé, la différence entre les deux méthodes utilisées est généralement inférieure à 10% et ne dépasse jamais 15%. Compte tenu du nombre important de manipulations nécessaires avant d'obtenir la somme des hémicelluloses et de la complexité de cette fraction, les différences observées nous semblent tout à fait acceptables.

Nous avons utilisé ces deux méthodes car elles sont complémentaires. L'une donne un résultat global de tous les générateurs de furfural, éléments essentiels des hémicelluloses, l'autre permet à la fois de caractériser les oses constitutifs de ces polyhosides et de distinguer les trois fractions solubles dans l'eau, dans l'acide dilué et dans l'acide concentré. En effet, cette méthode nous a permis de déterminer que 50 à 60% des hémicelluloses, des graines entières, étaient hydrosolubles. Cette proportion est de 60 à 80% dans les cotylédons, le plus fort pourcentage correspondant aux cotylédons de pois lisse. Par contre, considérées très globalement, les hémicelluloses totales des téguments de féverole, de pois ridé et de pois lisse, sont uniformément réparties entre les trois fractionsde solubilités différentes. Seules, dans les téguments de lupin, 50% des hémicelluloses sont solubles dans l'acide dilué.

4.2.3 - "Polymères de glucose, non cellulosiques".

Dans la féverole (tableau X V), la somme des "polymères de glucose non cellulosiques" dosés dans le filtrat de l'attaque par la glucoamylase (glucanes hydrosolubles) et dans l'hydrolysat de l'acide dilué, après neutralisation (glucanes acidosolubles), est faible dans la graine entière (0,9%) et les cotylédons (0,3%) alors qu'elle est de 3% dans les téguments. Ces résultats sont plus faibles que ceux obtenus par PRITCHARD et al. (1973) qui trouvent 1,6% de glucanes dans la graine entière. Cette plus faible teneur pourrait éventuellement s'expliquer par le fait que les variétés considérées sont différentes. En effet, nous en avons déjà dosé 1,6% dans la graine entière d'une autre variété de féverole.

Nous observons les mêmes tendances dans le pois lisse (tableau X VIII) que dans la féverole, bien que les quantités présentes dans les différents éléments histologiques soient plus faibles.

Dans le lupin (tableau X VI), nous pouvons faire les mêmes observations car ce sont les téguments qui renferment la plus grande quantité de glucanes totaux mais, contrairement à la féverole, ce sont les cotylédons (1%) qui en contiennent trois fois plus que la graine entière (0,3%).

Si la quantité de glucanes dosés dans les téguments du pois ridé (tableau X VII) est comparable à celle trouvée dans les autres téguments, il n'en est pas de même en ce qui concerne la teneur en glucanes des cotylédons. En effet, la valeur de 3,1% nous a semblé d'autant plus improbable que les téguments en contiennent 2,7% et la graine entière 2%. En conséquence, nous avons été amenés à faire un certain nombre de vérifications qui sont valables, non seulement pour le pois ridé, mais pour toutes les autres graines.

Une première expérience a consisté à contrôler l'hydrolyse de l'amidon par la glucoamylase, par chromatographie sur papier. Un volume de filtrat de l'attaque par la glucoamylase, correspondant à environ 10 mg de glucose, a été déposé sur le chromatogramme. Dans tous les cas, nous n'avons pu mettre en évidence que des traces de maltose.

Compte tenu de la grande difficulté, généralement rencontrée, pour disperser un amidon riche en amylose, il nous a semblé nécessaire d'examiner le résidu insoluble du filtrat de l'attaque par la glucoamylase (résidu II), au microscope optique polarisant. Nous n'avons observé des grains d'amidon intacts que dans le résidu du pois ridé. Il est donc évident que les glucanes acido-solubles dosés dans les cotylédons et dans la graine entière du pois ridé, proviennent, du moins, en partie d'une dégradation incomplète de l'amidon.

Ces vérifications nous permettent de penser que le glucose dosé en tant que "polymères de glucose non cellulosiques", dans les graines de féverole, de lupin et de pois lisse, ne provient pas d'une dégradation incomplète de l'amidon. Un argument en faveur de cette hypothèse pourrait être le fait que les teneurs en glucanes sont les plus élevées dans les téguments où l'amidon est presque absent. Cette fraction pourrait correspondre aux "β-glucanes" dont la présence a été remarquée par PRITCHARD et al. (1973), dans la graine de féverole.

Toutefois, ces observations ne lèvent pas totalement l'ambiguité de l'origine de ce glucose. Dans ce but, nous avons tenté de caractériser des produits de dégradation de ces glucanes. Les filtrats de l'attaque par la glucoamylase, des téguments, ont été soumis à une hydrolyse ménagée (HCl 0,7 N pendant 15 et 60 minutes). Un volume donné des hydrolysats neutralisés, a été déposé sur un chromatogramme. Les témoins utilisés sont des hydrolysats de β-glucanes, de structure connue : la laminarine, contenant des liaisons β (1-3) et β (1-6) et le lichénane avec 75% de liaisons β (1-3) et 25% de liaisons (β 1-4).

Le chromatogramme, qui est représenté schématiquement sur la figure 11, nous permet de faire les remarques suivantes :

- pour un temps d'hydrolyse de 15 minutes, nous observons des trainées de couleur grise, correspondant aux "polymères de glucose" non entièrement hydrolysés. Nous pouvons, tout de même, distinguer une tache de même valeur Rf que le glucose, semblant provenir d'un début d'hydrolyse des glucanes ainsi qu'une

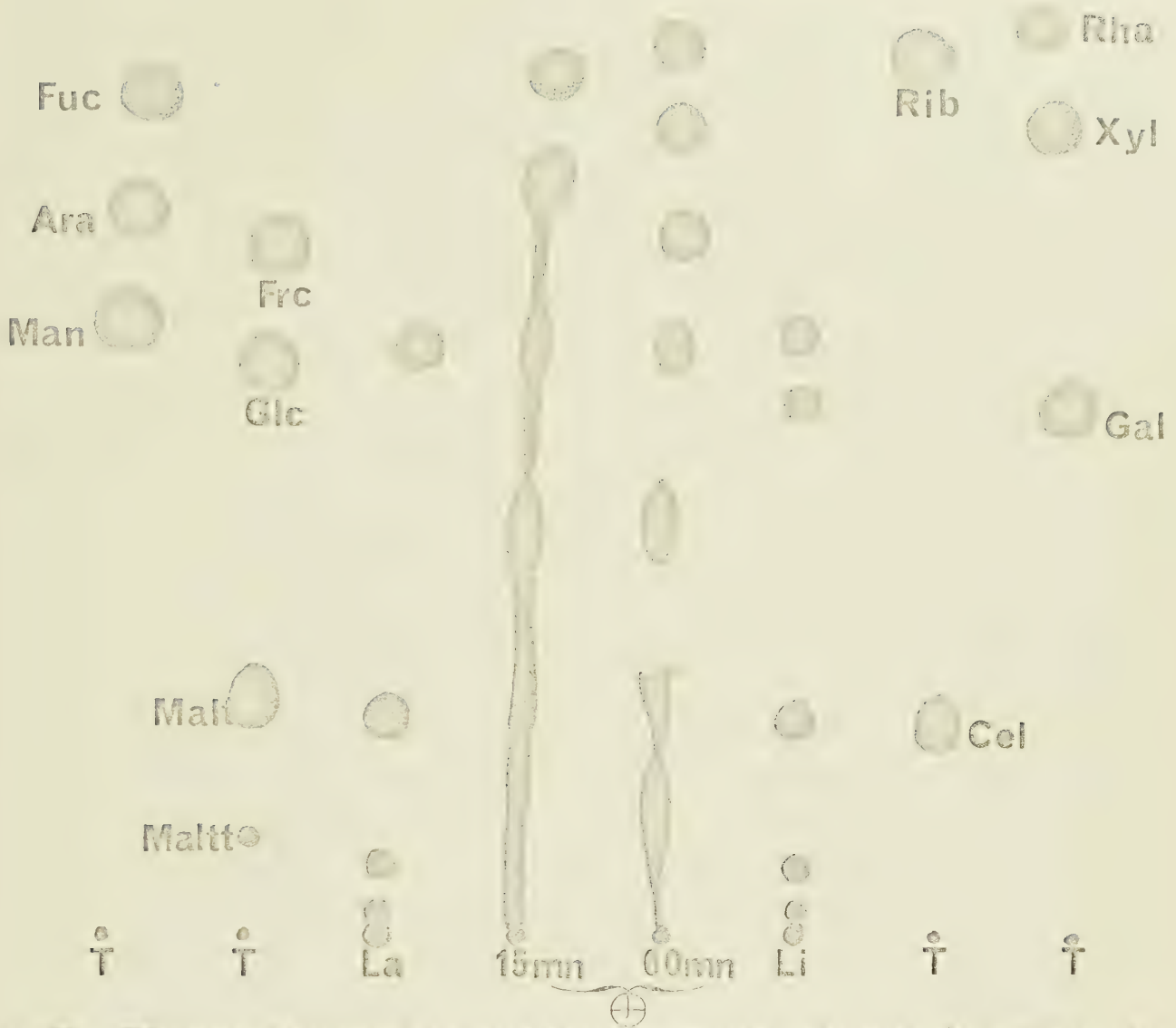


Fig 11 : Chromatographie, sur couche mince de gel de silice, des hydrolysats des ß-glucanes contenus dans le filtrat de l'attaque par la glucoamylase des téguments de féverole.

3 élutions par le solvant chloroforme- acide acétique-eau [44/47/3, v/v]. Révélation par pulvérisation du réactif à la diphényl-amine aniline.

⊕ : temps d'hydrolyse des ß-glucanes.

Témoins : Hydrolysat de Laminarine [La], Hydrolysat de Lichenane [Li], Arabinose [Ara], Cellobiose [Cel], Fructose [Frc], Fucose [Fuc], Galactose [Gal], Glucose [Glc], Maltose [Malt], Maltotriose [Maltt], Mannose [Man], Rhamnose [Rha], Ribose [Rib], Xylose [Xyl].

tache de couleur grise, située sur ce chromatogramme, entre le glucose et le maltose. Cette même tache a également été observée par MERCIER (1975), dans les hydrolysats de levure d'Endomycopsis fibuligera, connue pour contenir une fraction de β-glucanes.

- au bout de 60 minutes, l'intensité des trainées diminue. Une tache de valeur Rf, semblable aux diholosides maltose et cellobiose, se distingue mais sa couleur est gris-jaune et non bleue, comme celle des témoins cités. La tache grise observée auparavant est toujours présente et la tache de glucose apparaît plus nettement.

Il n'est pas facile d'interpréter ces résultats d'une façon catégorique, car nos remarques sont basées sur des observations subjectives, faisant appel à l'appréciation de la couleur des substances de référence. Mais, celles-ci sont suffisamment différentes pour être prises en considération. En effet, les produits d'hydrolyse du lichénane sont, après révélation à la diphénylamine aniline, d'une couleur bleue alors que ceux provenant de l'hydrolyse de la laminarine sont gris. Compte tenu de la couleur, également grise, de nos hydrolysats, nous pensons que si une fraction du type "β-glucane" existe dans les graines de légumineuses, elle serait du type laminarine, mais, c'est là une hypothèse qui doit être confirmée par une étude plus approfondie de cette fraction

Parallèlement, cette expérience nous a permis de mettre en évidence que les générateurs de furfural hydrosolubles sont essentiellement constitués de xylose et de rhamnose et de faibles quantités d'arabinose.

Nous avons fait les mêmes expériences avec les autres filtrats de l'attaque par la glucoamylase, elles nous ont amenés aux mêmes observations. Toutefois, c'est uniquement dans le cas du lupin que l'hydrolyse ménagée a fait apparaitre du galactose. Il n'est pas exclu que ce galactose provienne de galactomannes dont la présence a été signalée dans certaines graines de légumineuses et en particulier dans celles dépourvues d'amidon (MAC CLEARY et MATHESON, 1976).

L'ensemble des résultats obtenus nous permet de reconsidérer le bilan analytique de la composition biochimique globale des graines de légumineuses (tableau II, III, IV et V) qui avait montré certaines imperfections.

Les teneurs en β-glucanes et en pectines n'avaient pas été prises en considération dans ce bilan. De plus, les résultats obtenus après étude détaillée des α-galactosides (cf chapitre II) ont montré que les valeurs obtenues par le réactif à l'orcinol et exprimées par rapport au stachyose rendaient mieux compte de la teneur en glucides éthanolosolubles totaux des graines de légumineuses étudiées que celle déterminées par le réactif à l'anthrone et exprimées en glucose.

Ainsi, en tenant compte à la fois des teneurs en β-glucanes, en pectines et en glucides éthanolosolubles totaux déterminées par le réactif à l'orcinol et exprimées en stachyose, notre premier bilan analytique se trouve modifié et permet d'aboutir aux résultats indiqués dans le tableau XIX).

Tableau XIX : Bilan analytique de la composition biochimique des graines de légumineuses, après étude approfondie des α-galactosides et des polyosides de structure.

FEVEROLE		LUPIN	
Graine entière	: 98,9%	Graine entière	: 96,4%
Cotylédons	: 99,8%	Cotylédons	: 96,2%
Téguments	: 98,5%	Téguments	: 104,2%
POIS RIDE		POIS LISSE	
Graine entière	: 103%	Graine entière	: 100,3%
Cotylédons	: 101,5%	Cotylédons	: 99,8%
Téguments	: 98,4%	Téguments	: 94,3%

A l'exception des téguments de pois lisse, notre bilan se situe entre 96,5% et 104,2%. Ceci représente une correction considérable (8 à 12%), dans le cas des téguments de féverole, de pois ridé et lisse et de la graine entière et des cotylédons de lupin.

Compte tenu du nombre de manipulations effectuées, nous pensons que ce bilan doit être considéré comme satisfaisant. Cependant, même après l'étude approfondie que nous venons d'exposer, nous pouvons formuler quelques remarques pour expliciter les légères imperfections qui persistent encore.

Le bilan d'environ 96% dans la graine entière et dans les cotylédons de lupin se serait sans doute modifié si nous avions pu doser les galactomannanes qui semblent être présents, au moins, en faible quantité dans cette graine.

On pourrait également penser que le résultat des hémicelluloses totales tient mieux compte de ces polyosides que les teneurs en générateurs de furfural totaux. En effet, le premier résultat comprend les sucres méthylés alors que le deuxième ne comprend que les pentoses. Ceci apparait s'appliquer particulièrement aux téguments de féverole et de pois lisse qui semblent contenir de plus grandes quantités de rhamnose que les téguments des autres graines. Ainsi, la prise en considération des teneurs en hémicelluloses totales amène le bilan analytique à 101,4% dans les téguments de féverole et à 96,5% dans les téguments de pois lisse.

Jusqu'ici, les observations concernent plus ou moins les problèmes posés par les constituants dont les dosages risquent de donner une valeur par défaut, mais le problème inverse peut également exister. Il en est ainsi, en ce qui concerne les matières pectiques, dont une partie a pu être dosée en tant que générateurs de furfural totaux. Par conséquent, pour éviter des valeurs en excès, il conviendrait d'appliquer un facteur de correction à la teneur en générateurs de furfural totaux, lorsqu'un matériel, tel que les téguments des graines de légumineuses, contenant une forte proportion d'acides uroniques est analysé.

RESUME ET CONCLUSIONS GENERALES.

Le travail que nous avons réalisé a permis d'approfondir nos connaissances dans le domaine de la composition glucidique des graines de légumineuses et de la répartition de cette fraction, entre les différents éléments histologiques de ces graines.

Dans une première partie nous avons étudié la composition biochimique globale des graines entières, des cotylédons et des téguments de féverole, lupin, pois ridé et pois lisse.

Ces graines ne se distinguent pas seulement par leur composition, mais aussi par leur taille et leur aspect extérieur. La féverole Bianka a un poids de 100 grains secs de 67,4 g et une proportion de téguments de 12,5 % alors que le lupin, d'un poids de 100 grains secs nettement inférieur (11,6 g) contient 24 % de téguments. Les graines des deux variétés de pois sont de taille supérieure à celle des graines de lupin alors que les proportions de téguments sont nettement plus faibles, elles représentent en effet, 10,7 % dans le pois ridé et 8,65 % dans le pois lisse (tableau I).

Parmi les constituants non glucidiques de ces graines, ce sont évidemment les protéines qui représentent la fraction pondéralement la plus importante. En comparaison, la graine de lupin est la plus riche en protéines avec une teneur de 41,4 %, alors que les graines de féverole et de pois ridé en contiennent de l'ordre de 31 %, la graine de pois lisse est la moins riche puisqu'elle n'en renferme que 26 %.

Les graines de féverole et de pois ont des teneurs faibles en lipides alors que la graine de lupin en contient de l'ordre de 6 %.

La considération de la composition glucidique des graines de légumineuses fait apparaître des différences parfois très importantes. En effet, l'amidon est pratiquement absent de la graine de lupin alors qu'il représente près de 40 % de la graine de féverole, résultats très comparables aux travaux antérieurs

(PRITCHARD et al., 1973 ; CERNING et al., 1975 ; HOVE, 1974). Nous confirmons que le pois lisse est plus riche en amidon que le pois ridé, comme MAC READY (1950) l'a déjà observé. L'amidon de pois ridé peut contenir entre 66 et 90 % d'amylose, tandis que celui de pois lisse peut en renfermer de 29 à 35 % (COURTOIS, 1971). MERCIER (1970) a déjà constaté, dans le cas du maïs, que la quantité d'amidon synthétisé par la graine est d'autant plus importante que la teneur de la graine en amylose est faible.

Les teneurs en polyosides de structure des graines de féverole et de pois lisse sont très comparables(environ 10 %), elles sont respectivement de l'ordre de 15 % et 25 % dans les graines de pois ridé et de lupin.

Nos résultats relatifs à la teneur en glucides éthanolosolubles de la graine de féverole (7 %) et de lupin (9,5 %) sont en bon accord avec ceux de CERNING et al. (1975) et de HOVE (1974). Par contre, dans le cas du pois lisse, nos teneurs étant supérieures à celles indiquées par TAUFEL et al. (1960), nous pensons que ceci est vraisemblablement dû au fait que les variétés considérées sont différentes. De même que la graine de lupin, la graine de pois ridé est plus riche en glucides éthanolosolubles que les deux autres graines.

La comparaison des résultats concernant les téguments et les cotylédons permet de constater que les protéines et les glucides de réserve sont essentiellement localisés dans les cotylédons alors que les polyosides de structure se trouvent préférentiellement dans les téguments dont ils représentent 80 à 90 %.

A l'exception du lupin, l'ensemble des résultats de la composition biochimique nous a permis d'obtenir un bilan analytique entre 95 et 100 %, dans les cotylédons et les graines entières ; par contre, ce bilan est de l'ordre de 90 % dans les téguments.

Dans une deuxième partie nous avons étudié, d'une façon détaillée, la fraction éthanolique des graines et de leurs éléments histologiques. Cette fraction est essentiellement constituée d'α-galactosides du saccharose qui, du point de vue nutritionnel

sont importants car ils semblent être à l'origine de phénomènes de flatulence chez les monogastriques (CRISTOFARO et al., 1970, 1972, 1974).

Dans cette partie nous avons fait appel à deux techniques d'identification des oses et osides, le fractionnement sur colonne de Bio-Gel et la chromatographie sur couche mince de gel de Silice. Ces deux techniques sont complémentaires parce que l'une sépare les oses et osides en fonction de leur poids moléculaire alors que l'autre permet de distinguer très nettement les oses et osides de même poids moléculaire.

Par chromatographie sur couche mince nous avons confirmé l'existence des α-galactosides du saccharose tels que raffinose, stachyose et verbascose dans l'extrait éthanolique de chaque graine. La séparation de cette fraction, sur colonne de Bio-Gel, a permis d'aller plus loin en identifiant l'ajugose et des fractions d'α-galactosides de poids moléculaire plus élevé dont l'une pourrait avoir un $\overline{DP}$ de 9 et l'autre un $\overline{DP}$ de 14-15. Des α-galactosides de poids moléculaire élevé ont déjà été identifiés dans d'autres plantes (HATTORI et HATANAKA, 1958), mais leur présence dans les graines de légumineuses n'a jamais été démontrée auparavant.

Nous avons également constaté la présence de constituants de faible poids moléculaire mais il ne nous a pas été possible de les identifier. Tout ce que nous pouvons affirmer, pour l'instant, c'est qu'il ne s'agit ni de pentoses ni de sucres méthylés, étant donné que leur couleur après révélation à la diphénylamine aniline n'est pas identique à celle de ces témoins.

L'exploitation quantitative des chromatogrammes des extraits éthanoliques a permis de déterminer les teneurs en α-galactosides des différentes graines et de leurs constituants histologiques. Dans tous les cas, les téguments ne contiennent que de faibles quantités d'oses et osides qui sont en grande majorité localisés dans les cotylédons. Parmi les graines étudiées, ce sont les cotylédons de lupin et de pois ridé qui sont les plus riches en

α-galactosides. En effet, leur teneur en raffinose est de l'ordre de 2,5 %. Les teneurs en stachyose et verbascose sont respectivement de 4,7 et 4,2 % dans le pois ridé et de 8,1 et 5,2 % dans le lupin. C'est là une composition en α-galactosides qui peut ne pas être sans importance dans l'utilisation de ces graines en alimentation animale. Nous remarquons, par ailleurs, que la graine de lupin est la seule à contenir près de 1 % d'ajugose.

Les teneurs en α-galactosides des cotylédons de féverole et de pois lisse sont nettement plus faibles que dans les autres cas. En effet, les valeurs obtenues dans le pois lisse sont égales à environ la moitié de celles trouvées dans le pois ridé. Ceci est également vrai en ce qui concerne la teneur en verbascose des cotylédons de féverole mais leur contenu en stachyose et en raffinose, respectivement de 1,1 et 0,3 % est de loin, le plus faible.

Nous confirmons donc les travaux antérieurs concernant la présence des α-galactosides du saccharose dans les graines de légumineuses. Mais, nous sommes allés plus loin en utilisant la technique de chromatographie sur gel de polyacrylamide qui permet de séparer et de déterminer quantitativement les oses et osides, au moins jusqu'à un $\overline{DP}$ de 6.

Par contre, nous infirmons les observations de PRITCHARD et al. (1973) pour qui les graines de féverole contiennent des quantités variables de maltose, maltotriose et maltotétraose. Nous n'avons, en effet, jamais pu identifier de tels produits de dégradation de l'amidon. Ceci d'ailleurs, ne semble pas surprenant, étant donné qu'il est connu que l'activité amylasique de cette graine est extrêmement faible, sinon absente (DE FEKETE, 1969). De plus, l'évolution des oses et osides, au cours de la germination, indique l'absence d'amylose, tout au moins, dans les premiers jours. En effet, on constate toujours une diminution des α-galactosides, en particulier du verbascose et du stachyose et une augmentation du saccharose (TAUFEL, 1960).

Par contre, les seuls échantillons dans lesquels nous avons pu identifier, en faibles quantités, des produits de dégradation des α-galactosides sont les téguments de féverole. Dans ce cas, la chromatographie sur couche mince a permis de distinguer du glucose, du galactose, du fructose et des traces de mélibiose, ce qui indique une activité α-galactosidase et invertase.

Avec les résultats ainsi obtenus nous pensons avoir contribué à une connaissance plus approfondie des oses et osides présents dans les différentes graines de légumineuses. Mais, nous avons été confrontés à des difficultés extrêmement importantes, à différents stades de notre travail. En effet, il n'a pas été facile de trouver un moyen d'expression des glucides éthanolosolubles totaux qui rende compte, le mieux possible, de la complexité de cette fraction.

Ainsi, la proposition du dosage en direct à l'orcinol et l'expression des résultats par rapport à une gamme de stachyose -la réaction à l'orcinol étant étroitement liée au fractionnement après Bio-Gel- doit être considérée comme une première tentative ; elle nous a semblé, pour l'instant, la moins aberrante. Toutefois, aussi longtemps que les témoins purs tels que le verbascose et l'ajugose ne sont pas disponibles, nous serons toujours limités dans l'obtention de résultats d'une valeur absolue. A l'heure actuelle, le problème essentiel rencontré, au cours de l'analyse quantitative des α-galactosides, se situe sans doute, à ce niveau.

Dans la dernière partie de notre travail, nous avons étudié, tant sur le plan qualitatif que quantitatif, <u>les polyosides de structure</u> et parmi eux, tout spécialement les hémicelluloses.

Il est logique que l'essentiel de ces constituants soit localisé dans les téguments et qu'une relativement faible partie d'entre eux se trouve dans les cotylédons. En comparant les graines entre elles, nous constatons que la graine de lupin est la plus riche en polyosides de structure avec une teneur en hémicelluloses de l'ordre de 10 % et en cellulose de l'ordre de 15 %.

Les teneurs sont proches dans la féverole et le pois lisse (4,8% d'hémicelluloses et 5,2 % de cellulose). Le pois ridé a des valeurs qui sont intermédiaires entre celles de ces graines et celles des graines de lupin.

Par ailleurs, le schéma de fractionnement nous a permis de distinguer trois fractions d'hémicelluloses dont celle dénommée hydrosoluble constitue la partie la plus importante. Les quantités des deux fractions obtenues après hydrolyse acide ménagée et hydrolyse par l'acide concentré varient en fonction de l'élément histologique de la graine considéré. Mais, l'intérêt principal des hydrolyses successives réside dans le fait qu'il est possible, à chaque stade, d'apprécier les oses qui constituent ces différentes fractions. Ainsi, nous avons pu démontrer que le xylose est le constituant quantitativement le plus important dans toutes les fractions d'hémicelluloses. L'hydrolyse ménagée libère en plus, de faibles quantités d'arabinose, de glucose, de galactose et de rhamnose, tandis que l'hydrolysat en milieu acide concentré montre la présence de grandes quantités de glucose provenant de l'hydrolyse de la cellulose et de faibles quantités de rhamnose, dans tous les cas.

Cette composition des hémicelluloses des graines de légumineuses est en accord avec celle indiquée dans la littérature mais nous sommes les premiers à avoir identifié le rhamnose dans les hémicelluloses du pois.

Cette étude qualitative qui a mis en évidence la prépondérance du xylose dans toutes les fractions hémicellulosiques et dans toutes les graines a permis de justifier l'expression des résultats du dosage des générateurs de furfural totaux par rapport à une gamme de xylose.

Nous avons également dosé deux fractions de polymères de glucose, en quantité beaucoup plus importante dans les téguments que dans les cotylédons qui pourraient correspondre aux β-glucanes identifiés dans la graine de féverole par d'autres auteurs

(PRITCHARD et al., 1973). Nous pensons que si une fraction de type β-glucane existe dans les graines de légumineuses, elle serait du type laminarine mais avant de confirmer cette hypothèse une étude beaucoup plus approfondie de cette fraction serait nécessaire.

En tenant compte de cette fraction et de la teneur en matières pectiques, de l'ordre de 4 % dans les téguments, il a été possible de corriger le premier bilan analytique, en particulier celui des téguments, et de l'amener à une valeur comprise entre 96 et 104 %.

La composition biochimique globale et en particulier la composition glucidique de la graine de féverole Bianka se situe dans la moyenne des résultats obtenus avec d'autres variétés de cette graine.

Pour l'instant, le nombre de variétés de lupin et de pois que nous avons étudiées est trop limité pour en tirer des conclusions à caractère général. Cependant, nous pensons avoir apporté des éléments nouveaux dans le domaine des glucides des graines de légumineuses et en particulier en ce qui concerne leur localisation dans les différentes parties de la graine. Parallèlement nous pensons que notre étude peut servir de point de départ à un ensemble de recherches plus fondamentales dans des domaines encore insuffisamment connus comme les α-galactosides de poids moléculaires élevé, les substances de faible poids moléculaire de nature inconnue et les β-glucanes.

- REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES -

- BAILEY R.W., MILLS S.E., HOVE E.L., 1974. Composition of Sweet and Bitter Lupin Seed Hulls with Observations on the Apparent Digestibility of Sweet Lupin Seed Hulls by Young Rats. J. Sci. Fd. Agric., 25, 955-961.

- BANERJI N., RAO C.V.N., 1963. Structural studies on an Arabinoxylan from Pea-Skin (Pisum sativum). Can. J. Chem., 41, 2844-2848.

- BANERJI N., RAO C.V.N., 1963. An Arabinoxylan Extracted by 18% Alkali from Pea-Skin (Pisum sativum). J. Indian Chem. Soc. 40, 941-944.

- BATTY R.S., 1974. Chemical composition of some faba bean cultivars. Can. J. Plant. Sci., 54, 413-421.

- CERNING J., 1970. Contribution à l'étude de l'évolution de la composition glucidique des grains de céréales au cours de leur maturation : maïs, blé, orge. Thèse de doctorat d'Université, mention Sciences. Lille n° d'enregistrement 80.

- CERNING J., GUILBOT A., 1973. A specific method for the determination of pentosans in cereals and cereal products. Cereal Chemistry, 50, 2, 176-184.

- CERNING J., SAPOSNIK A., GUILBOT A., 1975. Carbohydrate Composition of Horse Beans (Vicia faba) of Different Origins. Cereal Chemistry, 52, 2, 125-138.

- CERNING-BEROARD J., 1975. The use of invertase for determination of sucrose. Application to cereals, cereal products and other plant. Cereal Chem., 52, 3, 431-438.

- C.N.E.R.N.A., 1958. Détermination du taux de cendres selon la méthode de référence mentionnée dans "Méthodes analytiques des céréales du C.N.E.R.N.A.". 187-197.

- C.N.E.R.N.A., 1958. Teneur en lipides déterminée selon la méthode de référence mentionnée dans "Méthodes analytiques des Céréales du C.N.E.R.N.A.", 224-243.

- COURTOIS J.E., ARCHAMBAULT A., LE DIZET P., 1956. Identification du verbascose dans divers végétaux. Bull. Soc. Chim. Biol., 38; 351-358.

- COURTOIS J.E., ARCHAMBAULT A., LE DIZET P., 1956. Isolement d'un tétra galactosidosaccharose à partir des graines de Vesce et des racines de Sauge. Bull. Soc. Chim. Biol., 38, 359-363.

- COURTOIS J.E., 1960. Les galactosides du saccharose. Bull. Soc. Chim. Biol., 42, 12, 1451-1466.

- COURTOIS J.E., PERCHERON F., 1971. Distribution des monosaccharides, oligosaccharides et polyols. Ch 5, in : Chemotaxonomy of the leguminosae. Ed. by J.B. Harborne, D. Boulter and B.L. Turner. Academic Press London and New York, 207-229.

- CRISTOFARO E., MOTTU F., WUHRMANN J.J., 1970. Study of the effect of stachyose and raffinose on the flatulence activity of soy-milk. 3 rd. International Congress of Food Science and Technology, Washington, D.C.

- CRISTOFARO E., MOTTU F., WUHRMANN J.J., 1972. Study of the effect on flatulence of leguminous seeds oligosaccharides. Annual Meeting of the American Association of Cereal Chemistry, Miami.

- CRISTOFARO E., MOTTU F., WUHRMANN J.J., 1974. Involvement of the Raffinose Family of Oligosaccharides in Flatulence. In : Sugars in Nutrition, chap. 20. Ed. by H.L. Suppleand K.W. Mac Nutt. Academic Press, New York.

- DEA, I.C.M., MORRISSON A., 1975. Chemistry and interactions of seed galactomannans. In Advances in Carbohydrate Chem. and Biochem., 31, 241-312. Edited by R. Stuart Tipson - Derek Horton - Academic Press, New York - San Francisco - London.

- DE FEKETE M.A.R., 1969. Zum Stoffwechsel der Stärke, I - Die Umwandlung von Saccharose in Stärke in den Kotyledonen von Vicia faba, Planta (Berl.), 87,311-323.

- DE FEKETE M.A.R., 1969. Zum Stoffwechsel der Stärke. I - Die Umwandlung der Stärke in Saccharose in den Kotyledonen von Vicia faba. Planta (Berl.) 87, 324-332.

- DE STEFANIS V.A., PONTE J.G., Jr., 1968. Separation of sugars by thin layer chromatography. J. Chrom., 57, 116-120.

- DUFFAU F., 1946. Nouvel appareil à entraînement par la vapeur. Application au microdosage des générateurs de furfural par une technique colorimétrique. Bull. Soc. Chim. Biol., 28, 10-12, 873-877.

- FRENCH D., 1954. The raffinose family of oligosaccharides. Advanc. Carbohyd. Chem., 9, 149-184.

- GIRI K.V., NIGAM V.N., 1953. Separation of simple saccharides and oligosaccharides by circular paper chromatography. Naturw., 40, 343-344.

- HANSEN R.P., CZOCHANSKA Z., 1974. Composition of the Lipids of Lupin Seed (Lupinus angustifolius L. var. "Uniwhite"). J. Sci. Fd. Agric., 25, 409-415.

- HATTORI S., HATANAKA S., 1958. Oligosaccharides in Verbascum thapsus L. . The Botanical Magazine. Tokyo, 71, 417-427.

- HOVE E.L., 1974. Composition and protein quality of Sweet Lupin seed. J. Sci. Fd. Agric., 25, 851-859.

- HUGGET, A.S.O., NIXON D.A., 1957. Enzymatic determination of blood glucose. Biochem. J., 66, 12.

- JOHN M., TRENEL G., DELLWEG H., 1969. Quantitative chromatography of homologous glucose oligomers and other saccharides using Polyacrylamide Gel. J. Chromatogr., 42, 476-484.

- KAWAMURA S., NARASAKI T., 1958. Fucose as a constituent of hemicellulose B_1 from broad-bean seeds. Bull. Agr. Chem. Soc. Japan, 22, 436-437.

- KESLER R.B., 1967. Anal. Chem. 39, 1416.

- LINEBACK D.R., KE C.H., 1975. Starches and low-molecular-weight carbohydrates from chick pea and horse bean flours. Cereal Chem., 52, 334-347.

- LOEWUS F.A., 1952. Improvement in anthrone method for the determination of carbohydrate. Anal. Chem., 24, 219.

- MAC CLEARY B.V., MATHESON N.K., 1976. Galactomannan utilization in germinating legume seeds. Phytochemistry., 15, 43-47.

- MAC COMB E.A., MAC CREADY R.M., 1952. Colorimetric determination of pectic substances. Anal. Chem., 24, 1630-1633.

- MAC READY R.M., GUGGOLZ J., SILVEIRA V., OWENS H.S., 1950. Anal. Chem.,22, 1156.

- MARAIS J.P., DEWIT J.L., QUICKE G.V., 1966. A critical examination of the Nelson - Somogyi method for the determination of reducing sugars. Anal. Biochem., 15, 373.

- MERCIER C., CHARBONNIERE R., GALLANT D., GUILBOT A., 1970. Evolution de quelques caractéristiques des amidons de grains de maïs normal et d'amylomaïs au cours de leur formation. Die Stärke, 22, 9-16.

- NELSON N., 1944. A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. J. Biol. Chem., 153, 375-380.

- NIGAM V.N., GIRI K.V., 1961. Sugars in pulses. Can. J. Biochem. Physiol., 39, 1847-1853.

- PIRT S.J., WHEALAN W.J., 1951. The determination of starch by acid hydrolysis. J. Sci. Food. Agric., 2, 224-228.

- PRITCHARD P.J., DRYBURGH E.A., WILSON B.J., 1973. Carbohydrates of Spring and winter field beans (Vicia faba L.). J. Sci. Fd. Agric., 24, 663-668.

- ROBIN J.P., TOLLIER M.T., 1976. Application de la chromatographie de perméation sur gel de polyacrylamide à la détermination des α-galactosides des différentes graines. J. of Chromatography, en préparation.

- SALO Maïja Liisa, 1965. Determination of carbohydrate fractions in animal foods and faeces. Suomen Maataloustieteellisen Seuran Julkaisuja. 105. Acta Agralia Fennica.

- TANUSI S., KASAI T., KAWAMURA S., 1972. Determination of oligosaccharides in some Edible Legume Seeds. J. Jap. Soc. Food and Nutr., 25, 1, 25-27.

- TAUFEL K., RUTTLOF H., FREISE R., 1962. Zur Bestimmung der Glucose in Stärkesirup mittels Glucose-oxydase. Die Stärke, 14, 309-318.

- TAUFEL K., STEINBACH K.J., VOGEL E., 1960. Mono. und oligosaccharide einiger Leguminosamen sowie ihr Verhalten bei Lagerung und Keimung. Z. Lebenswittel. Unters-Forsch., 112, 31-40.

- THIVEND P., MERCIER C., GUILBOT A., 1972. Determination of starch with glucoamylase. VI. General carbohydrate methods. In : Methods in carbohydrate chemistry., 100-105. Ed. by R.L. Whistler and J.N. Be Miller. Academic Press, New York and London.

- TOLLIER M.T., 1965. Contribution à l'étude du rayonnement γ sur les caractères physico-chimiques de l'amidon et sa sensibilité aux amylases. Thèse d'ingénieur du C.N.A.M., Paris.

- TOLLIER M.T., 1975. Résultats non publiés.

- TOLLIER M.T., ROBIN J.P., 1976. Adaptation de la méthode à l'orcinol sulfurique au dosage automatique des oses, des oligosides et polyosides neutres totaux. Conditions d'application. Ann. Technol. En préparation.

- TOMODA M., KITAMURA M., 1967. The polysaccharide from Lupinus luteus seed. Purification and properties of TWO polysaccharides. Chem. Pharm. Bull., 15, 1021-1024.

- TRENEL G., JOH? M., DELLWEG H., 1968. Gel chromatographic separation of oligosaccharides at elevated temperature. Febs Letter 2, 74-76.